

**Induktion einer ovalbuminspezifischen Immunantwort in
T-Zell-Rezeptor-transgenen DO11.10-, OT-I- und OT-II-Mäusen
durch intraperitoneale Gabe von Hühnerovalbumin**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von Kerstin Arndt,
geboren am 15.10.1981 in Leipzig

angefertigt am Institut für klinische Immunologie,
Medizinische Fakultät der Universität Leipzig

Betreuer:
Prof. Dr. med. U. Sack

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 20.11.2012

Inhaltsverzeichnis:	Seite
Bibliographische Beschreibung	4
1. Einleitung	
1.1. Transplantationsmedizin	
1.1.1. Geschichte	5
1.1.2. Transplantationsmedizin heute	5-7
1.2. Immunsystem	
1.2.1. T-Zellen	7-9
1.2.2. T-Zell-Rezeptor (TCR)	9-11
1.2.3. T-Zell-Oberflächenmoleküle	11-12
1.2.4. Major Histocompatibility Complex (MHC)	13
1.2.5. Zellen der unspezifischen Abwehr	13-14
1.2.6. Der Komplex Immunsystem	14-15
1.3. Ziele der Arbeit	15-17
2. Material und Methoden	
2.1. Versuchstiere	18-19
2.2. Reagenzien	19-32
2.3. Versuchsaufbau	
2.3.1. Immunisierung mit Ovalbumin	32-33
2.3.2. Untersuchung der OT-Tiere	33-34
2.4. Statistik	35
3. Ergebnisse	
3.1. Einfluss der Ovalbuminmenge auf den IgG-Titer	36-39
3.2. Einfluss des Geschlechts auf den IgG-Titer	40-43
3.3. Einfluss des Alters auf den IgG-Titer	44-48
3.4. Einfluss der Versuchsreihen auf den IgG-Titer	49-50
3.5. Einfluss der DO11/CD4-Expression auf den IgG-Titer	51-53
3.6. Standardisierter ELISA	54
3.7. Einfluss der Ovalbuminmenge auf die KO-OD-Werte	55-57
3.8. Einfluss des Geschlechts auf die KO-OD-Werte	58-59
3.9. Einfluss des Alters auf die KO-OD-Werte	60-63
3.10. Einfluss der Versuchsreihen auf die KO-OD-Werte	64

3.11.	Einfluss der DO11/CD4 - Expression auf die KO-OD-Werte	64-66
3.12.	Die OT-I- und -II-Mäuse	68-71
3.13.	Untersuchung der Zellen der OT-II-Zucht	
3.13.1.	Blut	72-74
3.13.2.	Thymus	74-76
3.13.3.	Milz	76-80
3.13.4.	Zusammenfassung	80
4.	Diskussion	81-85
5.	Zusammenfassung	86-89
6.	Literaturverzeichnis	90-99
7.	Danksagung	100
8.	Anlagen	101-105

Bibliographische Beschreibung

Arndt, Kerstin

Induktion einer ovalbuminspezifischen Immunantwort in T-Zell-Rezeptor-transgenen DO11.10-, OT-I- und OT-II- Mäusen durch intraperitoneale Gabe von Hühnerovalbumin

Universität Leipzig, Dissertation

98 S., 68 Lit., 24 Abb, 17 Tab.

Referat:

Das Ziel dieser Arbeit war die Induktion einer ovalbuminspezifischen Immunantwort zur Etablierung eines einheitlichen Mausmodells, an dem eine Untersuchung der Toleranzinduktion durch einen CD4-Antikörper möglich ist. Es wurden DO11.10-, OT-I- und OT-II- (T-Zell-Rezeptor transgene) Mäuse mit einem Antigen immunisiert und dann die Höhe des spezifischen Antikörpertiters bestimmt. Das Antigen wurde an Aluminiumhydroxid gekoppelt. Die Applikation des Antigens (Hühnerovalbumin) erfolgte über eine intraperitoneale Injektion. Die Tiere wurden nach einem Monat mit der gleichen Antigendosierung einmalig geboostert. Es wurden Dosierungen zwischen 0 und 1500 µg verwendet. Blutentnahmen fanden vor der Immunisierung statt, am 3. und 6. Tag danach, sowie einen Monat nach der Blutentnahme vor Boosterung und 6 Tage danach.

Nach Auswertung der Daten wird deutlich, dass die ovalbuminspezifischen IgG-Titer abhängig sind von mehreren Faktoren, zu denen in erster Linie die applizierte Ovalbumindosis zählt, aber auch Geschlecht und Alter der DO11.10-Mäuse. Laut den Versuchsergebnissen sind 250 µg die optimale Ovalbumindosis. Außerdem sollten Männchen für diese Art von Versuchen bevorzugt werden, da dieses Merkmal in den Versuchen einen eindeutigen Einfluss auf den IgG-Titer hat. Die Mäuse sollten im Alter von mindestens 12 und höchstens 22 Wochen für die Versuche ausgewählt werden. Die Menge an DO11.10⁺/CD4⁺-Zellen in den einzelnen Tieren hat nach unseren Ergebnissen keinen Einfluss auf den IgG-Titer. OT-I- und OT-II-Mäuse sind aufgrund einer Lymphomerkrankung nicht für weitere Versuche oder Zucht geeignet.

1. Einleitung

1.1. Transplantationsmedizin

1.1.1. Geschichte

Die Anfänge der Transplantationsmedizin liegen weit zurück. Man fand Aufzeichnungen über Hauttransplantation aus Indien, datiert auf das Jahr 450 n. Chr. [Vorlaender 1983]. Aufgrund fehlender Möglichkeiten, die transplantierten Organe adäquat an die Blutgefäße des Körpers zu adaptieren, vor allem jedoch, weil der Abstoßungsprozess zu dieser Zeit noch unbekannt war, mussten diese Versuche fehlschlagen. Erst mit dem Verständnis für immunologische Vorgänge im menschlichen Körper und der Entwicklung der Mikrochirurgie gelangen die ersten erfolgreichen Organtransplantationen.

Mit der Zulassung des Immunsuppressivums Cyclosporin A im Jahre 1983 wurde die Hürde der Abstoßungsreaktion genommen und die Organtransplantation zwischen nicht miteinander verwandten Menschen ermöglicht. Im Laufe der Zeit kamen zahlreiche weitere immunsupprimierende Substanzen hinzu, wie zum Beispiel Tacrolimus oder Methotrexat, mit unterschiedlichen Eigenschaften, aber leider auch erheblichen unerwünschten Nebenwirkungen [Pillai et Levitsky 2009].

1.1.2. Transplantationsmedizin heute

Die wichtigsten unerwünschten Wirkungen der bisherigen „klassischen“ Immunsuppressiva sind die Knochenmarksdepression und damit eine Panzytopenie, welche zu lebensbedrohlichen Infekten führen kann und das erhöhte Risiko, an einer malignen Neoplasie zu erkranken. Außerdem weisen einige der bekannten Immunsuppressiva eine ausgeprägte Nephrotoxizität auf und sie können zu zytotoxischen Reaktionen (unter anderem reversibler Haarausfall und Gastroenteritis) führen, unter denen die Patienten oft einen hohen Leidensdruck und eine geringe Compliance entwickeln [Schrem et al. 2009].

Eine Organtransplantation bedeutet zudem für den Empfänger meist die lebenslange Einnahme dieser Medikamente. Das führt zu einem starken Anstieg des Risikos, im Laufe des weiteren Lebens an einem Malignom zu erkranken. Besonders gefürchtet

sind in diesem Zusammenhang die niedrigmalignen Non-Hodgkin-Lymphome, welche vor allem in fortgeschrittenen Stadien eine sehr schlechte Prognose haben. Die Lymphome werden eingeteilt in den Morbus Hodgkin, dessen Pathogenese bis heute nicht endgültig geklärt werden konnte, und in Non-Hodgkin-Lymphome, zu denen alle anderen B- und T-Zell-Lymphome zählen, sowie die Formen, die aus peripheren Vorläuferzellen hervorgehen [Trümper et al. 2001]. Als Spätwirkung der Chemotherapien sind alle niedrigmalignen Non-Hodgkin-Lymphome gefürchtet, da sie im Frühstadium kaum oder lediglich unspezifische Symptome (z.B. Müdigkeit und Abgeschlagenheit) verursachen, auf eine Behandlung jedoch nur schlecht ansprechen. Aber auch andere bösartige Neubildungen im menschlichen Körper werden begünstigt. Regelmäßige Vorsorgeuntersuchungen und Arztbesuche sowie Krankenhausaufenthalte, sowie eine gute Mitarbeit von Seiten des Patienten sind daher bei einer Transplantation unabdingbar.

Umso wichtiger war die Entwicklung der monoklonalen Antikörper [Köhler et Milstein 1975]. Mit ihnen verbunden war die Hoffnung auf eine gravierende Verkürzung der Therapiedauer und auf eine deutliche Reduktion der Nebenwirkungen.

Die Angriffspunkte der Antikörper und damit die Wirkprinzipien und Nebenwirkungsprofile sind sehr unterschiedlich. So existieren zum Beispiel Antikörper gegen den Rezeptor für Interleukin-2 (CD25). Durch dessen Blockade wird eine Expansion von durch ein Antigen (in dem Fall das Spenderorgan) aktivierten T-Lymphozyten verhindert und damit zelluläre Immunreaktionen gehemmt. Weiterhin existiert ein Antikörper, der sich gegen Bestandteile des CD3 Antigen-Rezeptor-Komplexes humaner T-Lymphozyten richtet (Muronomab). Dadurch soll es zur selektiven Verminderung dieser Lymphozytenklasse kommen [Fehr et. Wüthrich 2008]. Leider ist dieser Antikörper bisher nur für ganz spezielle Indikationen zugelassen, so unter anderem für die postoperative Phase nach Lebertransplantation. Aktuell werden monoklonale Antikörper gegen den Epidermal-Growth-Factor-Receptor in klinischen Studien getestet zur ergänzenden Therapie beim colorektalen Karzinom.

Das große Potential dieser Antikörper ist schon von vielen Arbeitsgruppen erkannt und untersucht worden. Monoklonale Antikörper könnten möglicherweise die bisher verwendeten Immunsuppressiva völlig ersetzen. Damit würden die schweren Nebenwirkungen (siehe oben) verschwinden. Idealerweise müsste der Patient nur noch über einen kurzen Zeitraum (Wochen oder Monate) mit dem Antikörper

behandelt werden und müsste später im Zusammenhang mit der Transplantation nur noch wenig oder keine Medikamente mehr einnehmen [Fehr et. Wüthrich 2008].

Darum existiert bereits eine Vielzahl von Studien, allerdings mit völlig unterschiedlichen Ansätzen. Jede Gruppe arbeitete mit unterschiedlichen Versuchstieren, Dosierungen und Arten von immunisierenden Substanzen und auch mit unterschiedlichen Arten und Dosierungen von Antikörpern. Das ist ein Grund, weshalb bis heute keine einheitliche Untersuchung und kein einheitliches Tiermodell zur Bestimmung der Idealdosis und des Nebenwirkungsprofils existieren.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, ein allgemeingültiges, funktionsfähiges Mausmodell zu erarbeiten, um die genaue Wirkungsweise, wirksame Dosen und mögliche Nebenwirkungen von monoklonalen Antikörpern wie dem Anti-CD4-Antikörper GK1.5 untersuchen und so Patienten besser vor unerwünschten Wirkungen schützen zu können.

1.2. Immunsystem

1.2.1. T-Zellen

Die in dieser Studie verwendeten Mausarten (DO11.10, OT-I und OT-II) haben gemeinsam, dass sie einen veränderten (transgenen) T-Zell-Rezeptor (TCR) haben. Darum soll hier näher auf die T-Zellen und speziell auf den TCR eingegangen werden.

T-Vorläuferzellen (Prä-Thymozyten) werden im Knochenmark und beim Feten in der Leber gebildet. Diese wandern im Laufe ihrer Entwicklung in den Thymus ein und entwickeln sich dort über die Stadien des frühen und allgemeinen zum reifen Thymozyten. Dieser kann sich in zwei Richtungen entwickeln. Entweder zur T-Helferzelle, welche mit B-Zellen interagieren, oder zu zytotoxischen T-Zellen, die für die Erkennung und Vernichtung (vor allem durch Viren) infizierter Körperzellen verantwortlich sind. Die Entwicklung der Prä-Thymozyten wird unterstützt durch von Thymusepithelzellen gebildete Hormone (unter anderem Thymulin, Thymopoetin und andere). Während dieser Entwicklung gibt es unter anderem Veränderungen der Oberflächenantigene und der Bestandteile des TCR (siehe Abbildung 1). Im Thymus selbst findet die Selektion der T-Zellen statt. Das heißt, die T-Zellen treten nach Ausbildung ihres TCR über diesen mit Epithelzellen des Thymus in Kontakt. T-Zellen, die nicht mit den Thymuszellen in Verbindung treten können oder körpereigene

Antigene erkennen, werden über Aktivierung eines Selbstmordprogrammes (Apoptose) eliminiert [Sprent & Kishimoto 2001]. Nur T-Zellen, die nicht auf körpereigene, aber auf körperfremde Antigene reagieren, überleben und reifen zur funktionsfähigen T-Zelle heran. Die reifen T-Zellen zirkulieren, nachdem sie den Thymus verlassen haben, im Blut- und Lymphsystem. Kommen sie auf ihrem Weg durch den menschlichen Körper mit fremden Antigenen in Kontakt, werden sie zu Memory-T-Zellen (Oberflächenmarker CD2, CD3, CD4, CD7, CD29 und CD45RO). CD29 ist ein Fibronektinrezeptor, der die Anhaftung der T-Zellen und ihre Fortbewegung verbessert. In Abbildung 1.2.1. ist die Entwicklung der T-Zelle dargestellt.

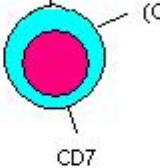
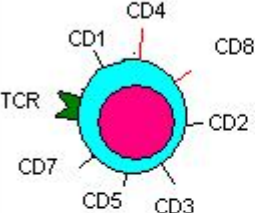
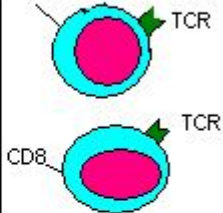
Knochenmark	Thymus		
Prä-Thymozyt	früher Thymozyt 	allgemeiner Thymozyt 	reifer Thymozyt 
T-Zell-Rezeptor Rearrangement gamma-Kette	Transkription gamma Kette Rearrangement beta-Kette	Oberflächenexpression alpha-, beta- und gamma Kette	vorwiegende Expression alpha- und beta-Kette
Oberflächenmarker TdT-Enzym (terminale Desoxy-ribonukleotransferase)	TdT, CD2, CD7 (CD1) = doppelt negativ	TdT, CD1, CD2, CD3, CD5 CD4 + CD8 CD7 = doppelt positiv	T-He + T-Zy: CD7, CD2, CD3, CD5 T-He: CD4 T-Zy: CD8 einfach positiv

Abbildung 1.2.1.: Entwicklung der T-Zelle [Burmester und Pezzuto 1998]:

In der ersten Zeile sind die Organe im Körper aufgeführt, in denen die darunter aufgeführten T-Zell-Entwicklungsstufen vorkommen, wobei sich der reife Thymozyt auch im Blut und den Lymphsystemen findet. In der zweiten Zeile sind die Entwicklungsstufen der T-Lymphozyten dargestellt. Die Oberflächenmoleküle des reifen Thymozyten sind in der Zeichnung nicht vollständig dargestellt. Hier sollen nur die Unterschiede zwischen CD4 und CD8 gezeigt werden. Dabei stellt die Zeichnung

der vierten Spalte eine T-Helferzelle dar (T-He) und darunter eine zytotoxische T-Zelle (T-Zy). Die dritte Zeile zeigt den Entwicklungsstand des TCR, bezogen auf den Entwicklungsstand der T-Zelle. Und in der vierten Zeile sind die Oberflächenmarker der einzelnen T-Zell-Entwicklungsstufen aufgeführt. „Doppelt negativ“ bedeutet dabei, dass CD4 und CD8 nicht exprimiert werden. Bei als „doppelt positiv“ bezeichneten Zellen werden sowohl CD4 als auch CD8 exprimiert. Und einfach positive Zellen exprimieren entweder CD4 oder CD8 auf ihrer Oberfläche [Burmester und Pezzuto 1998].

1.2.2. T-Zell-Rezeptor (TCR)

Der TCR dient den T-Zellen zur Erkennung von Antigenen sowohl körpereigener als auch körperfremder Herkunft, die meist von MHC-Molekülen (Major Histocompatibility Complex) präsentiert werden. Zusammengesetzt ist er aus jeweils zwei verschiedenen Glykoproteinketten (alpha- und beta- oder gamma- und delta-Ketten), deren Gensequenzen sich auf Chromosom sieben (beta und gamma) und Chromosom vierzehn (alpha und delta) befinden. Die Aminosäuresequenz der gamma-Kette ähnelt der der beta-Kette, während die delta-Kette eine ähnliche Abfolge der Aminosäuresequenzen hat wie die alpha-Kette [Schroeder 2008].

Der TCR gliedert sich in eine konstante (zelloberflächennah) und eine variable Region (zelloberflächenfern). Im Bereich der konstanten Region sind die beiden Ketten über Cystein-Verbindungen mit Disulfid-Brücken untereinander verbunden. Die variable Region ist bei der beta- und delta-Kette über ein zusätzliches J- oder D-Segment-Gen mit der konstanten Region verbunden. In Abbildung 1.2.2. ist der Aufbau des TCR schematisch dargestellt.

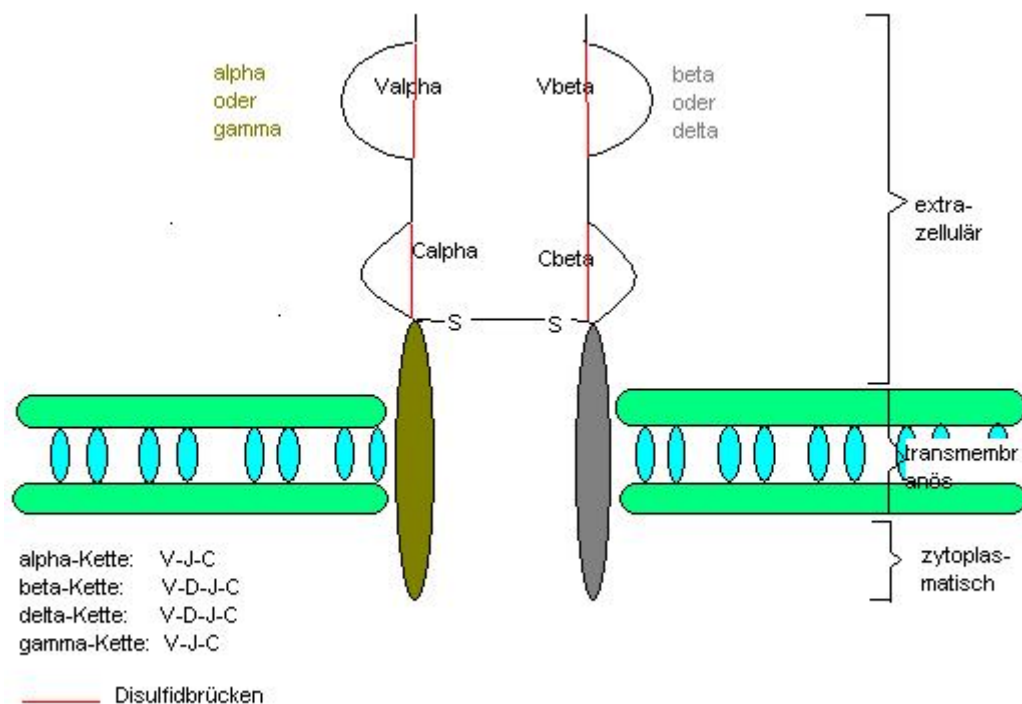


Abbildung 1.2.2.: Aufbau des T-Zell-Rezeptors [angelehnt an Burmester und Pezzuto 1998]. V_{alpha} beziehungsweise V_{beta} sind die variablen Regionen der alpha-beziehungsweise beta-Kette. C_{alpha} beziehungsweise C_{beta} sind die konstanten Regionen der alpha- beziehungsweise beta-Kette. Zwischen dem extrazellulären und dem transmembranösen Rezeptorteil sind die beiden Ketten über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden (-S-S-). Sowohl innerhalb der konstanten als auch der variablen Region bestehen Disulfidbrücken (rote Linien) [Neumann 2008].

Die auf menschlichen T-Zellen am häufigsten vorkommenden Ketten sind die alpha- und die beta-Ketten (insgesamt etwa 95 % der TCR). Sie werden vor allem von CD4⁺/CD8⁻-Zellen (66 %) und CD4⁻/CD8⁺-Zellen (33 %) exprimiert. Nur unreife und einige wenige reife T-Zellen (etwa fünf Prozent) tragen einen TCR mit der Kettenkombination gamma und delta. Von den Zellen, die diese Kettenkombination tragen, sind etwa 70 % doppelt negativ und bis 12 % doppelt positiv. Der Rest sind vor allem Zellen mit dem CD8-, aber ohne den CD4-Oberflächenmarker. Die Funktion der Zellen, die einen TCR mit der Kettenkombination gamma/delta tragen, ist noch weitgehend unbekannt. Vermutet wird eine Bedeutung bei der Bekämpfung von Mykobakterien.

Während der T-Zellentwicklung kommt es mehrfach zum „Rearrangement“ der genetischen Informationen der Ketten des TCR. Dies bedeutet, dass es durch

Deletion (Verlust von Genelementen), ungleichen Chromosomentausch (unterschiedlich lange Stücke von zwei Chromosomen werden gegeneinander ausgetauscht) oder Inversion (erst Bildung von Schlingen, dann Chromosomenbrüche und neue Einbindung der Bruchstücke in entgegengesetzter Richtung in das Chromosom = umgekehrte Transkriptionsrichtung) zu einem Umbau der genetischen Information der TCR-Ketten kommt. So ergibt sich eine große Variabilität von T-Zell-Rezeptoren und damit eine Erhöhung der Erfolgsrate bei der Bekämpfung körperfremder Antigene [Schmetzer 2009].

1.2.3. T-Zell-Oberflächenmoleküle

Die Oberflächenmarker werden international als Cluster of Differentiation (CD) bezeichnet und enthalten eine Nummer. Sie können mittels monoklonaler Antikörper identifiziert werden. Die CD-Oberflächenmarker übernehmen Schlüsselfunktionen bei der Abwehr körperfremden Materials. Diese Funktionen sind dabei so vielfältig, dass bisher noch immer nicht alle erforscht werden konnten.

Vom CD1-Antigen existieren verschiedene Isoformen (a bis e). Im menschlichen Körper wird es außer von T-Zellen auch von dendritischen Zellen und Thymozyten exprimiert. Dieses Antigen ist wahrscheinlich an der Präsentation von lipidhaltigen Antigenen beteiligt.

Das CD2-Molekül hingegen fungiert als Rezeptor für das CD58-Antigen. Es wird sowohl von T-Zellen, als auch von natürlichen Killerzellen (NK) exprimiert und ist wichtig für eine alternative T-Zell-Aktivierung mit oder ohne Einbeziehung des TCR. Alle T-Zellen und sich entwickelnde Thymozyten tragen den CD3-Oberflächenmarker. Dieser besteht aus mehreren membranständigen Molekülen und ist für eine T-Zell-Aktivierung über den TCR nach Kontakt mit dem MHC-Molekül essentiell. An der T-Zell-Aktivierung nach Kontakt mit antigenpräsentierenden MHC-Molekülen sind der TCR, CD3, CD4, CD8 und CD45 beteiligt. Durch das Zusammenspiel dieser Moleküle wird eine Signaltransduktion innerhalb der T-Zelle in Gang gesetzt, die am Ende zur Gen-Aktivierung mit nachfolgender Transkriptionsregulation führt.

Typisch für die T-Helfer-Zellen ist das CD4-Molekül. Allerdings findet es sich auch auf unreifen Thymozyten, Monozyten/Makrophagen, dendritischen Zellen und

eosinophilen Granulozyten. Wie oben bereits erwähnt, ist das CD4-Antigen für die Bindung des TCR an MHC-Moleküle, speziell MHC-II-Moleküle, erforderlich.

Auch dem CD8-Molekül kommt diese Bedeutung zu. Dieses tritt mit MHC-I-Molekülen in Verbindung. CD8 findet sich vorwiegend auf humanen zytotoxischen T-Zellen. Außerdem exprimieren auch unreife Thymozyten und teilweise NK-Zellen diesen Oberflächenmarker.

CD5-Moleküle werden, wie auch die CD7-Moleküle, von allen T-Zellen exprimiert. Außerdem findet sich das CD5-Antigen auch auf Thymozyten und vereinzelt auf B-Zellen. Es ist beteiligt an Zell-Zell-Interaktionen. Die Funktion von CD7 hingegen ist noch weitgehend unbekannt. [Wahn et al. 2005]

Zwei weitere wichtige Oberflächenmarker sollen hier noch erwähnt werden. Zum einen findet man auf T-Zellen das CD28-Molekül. Es ist beteiligt an der Auslösung eines „kostimulatorischen Signals“. Um eine T-Zelle zu aktivieren bedarf es neben dem Signal durch den TCR eines zweiten Signals. Dieses wird durch die Interaktion des CD28- mit den CD80- und CD86-Molekülen (auf antigenpräsentierenden Zellen zu finden) ausgelöst. Zum anderen tragen aktivierte T-Zellen den Oberflächenmarker CD152. Auch dieser bindet an CD80 und CD86, übermittelt jedoch ein die T-Zell-Aktivierung hemmendes Signal.

Durch den Einfluss verschiedener Zytokine sowie unterschiedliche Arten der Antigenexpression entstehen aus den T-Helfer-0-Zellen entweder TH1- oder TH2-Zellen. Diese beiden Zellarten unterscheiden sich vor allem in der Zytokinbildung und der Aktivierung unterschiedlicher Abwehrmechanismen.

Die TH1-Zellen bilden hauptsächlich Interleukin-2, Interferon- γ und Tumornekrosefaktor- β . Sie hemmen B-Zellen und damit die Antikörperbildung und aktivieren Makrophagen und führen zu ausgeprägten Entzündungsvorgängen.

Im Unterschied dazu bilden die TH2-Zellen überwiegend Interleukin-4 und -5. Sie aktivieren B-Zellen zur Antikörperproduktion [Romagnani 2000].

1.2.4. Major Histocompatibility Complex (MHC)

Bei Tierversuchen im Bereich der Transplantationsmedizin wurden auf der Suche nach Ursachen für Abstoßung die MHC-Komplexe entdeckt. Die Funktion dieser Komplexe ist die Präsentation von Antigenen auf Zelloberflächen. Im menschlichen Körper werden zwei große Gruppen der MHC-Komplexe unterschieden. Auf der einen Seite gibt es die MHC-I-Moleküle, die von allen Körperzellen exprimiert werden. Sie präsentieren an der Zelloberfläche endogene (in der Zelle synthetisierte) oder virale Proteine, auf die sie im endoplasmatischen Reticulum treffen. Die MHC-I-Komplexe interagieren mit CD8-positiven Zellen, welche durch den Kontakt aktiviert werden und als Reaktion lytische Enzyme freisetzen. Diese Enzyme sind in der Lage, zum Beispiel virusinfizierte Zellen zu zerstören. Auf der anderen Seite gibt es die MHC-II-Moleküle. Sie werden von antigenpräsentierenden Zellen (zum Beispiel dendritische Zellen in der Haut) exprimiert und sind für die Präsentation exogener (außerhalb der Zelle existierende und von der Zelle eingeschleuste) Antigene verantwortlich. Die MHC-II-Antigenkomplexe treten mit CD4⁺-Zellen über den TCR in Verbindung und aktivieren dieselben. Die aktivierten T-Zellen ihrerseits bilden verschiedene Zytokine (zum Beispiel Tumor-Nekrosefaktor und Interferone) zur Eliminierung eindringender Organismen. Außerdem regen sie B-Zellen zur Proliferation und Antikörperbildung an [Spencer et al. 2010].

1.2.5. Zellen der unspezifischen Abwehr

a) Monozyten

Monozyten werden durch Zytokineinfluss aus CD34-positiven Vorläuferzellen gebildet. Sie gehören zu den mononukleären Makrophagen und zirkulieren im Blut. In ihrem Zytoplasma tragen sie lysosomale Granula, welche Peroxidase und verschiedene Hydrolasen enthalten. Mit Hilfe dieser Granula können sie phagozytierte Antigene lysieren und anschließend die Reste der Antigene an ihrer Oberfläche präsentieren. Dabei werden mit Antikörpern beladene Antigene wesentlich besser phagozytiert als „unmarkierte“. Außerdem haben Monozyten proinflammatorische Eigenschaften, unter anderem durch die Ausschüttung von Zytokinen und Prostaglandinen. Gelangen diese Zellen ins Gewebe, differenzieren

sie zu Makrophagen aus. Die Makrophagen kehren nicht wieder ins Blutsystem zurück, sondern verbleiben im Gewebe, wo sie ihre Phagozytose-Eigenschaften noch weiterentwickeln.

Es existieren verschiedene spezifische Monozyten-Antigene. Dazu gehören zum einen das Leukozyten-Funktion-assoziierte Antigen-1 (= LFA-1, bestehend aus CD11a und CD18) und die Komplement Rezeptoren CR3 und CR4. Diese Antigene dienen der Adhäsion an Leukozyten. Ein Defekt in einem dieser Antigene kann zu einer hohen Infektanfälligkeit des betroffenen Individuums führen. Außerdem exprimieren Monozyten Rezeptoren für den Fc-Teil der IgG-Immunglobuline. Hier existieren drei verschiedene mit unterschiedlich hoher Affinität (CD64, CD32, CD16). So können mit Antikörpern beladene Antigene besser erkannt und schneller phagozytiert werden [Burmester & Pezzuto 1998].

b) Dendritische Zellen

Diese Zellart ist in nahezu allen Organen sowie vereinzelt auch im Blut anzutreffen. Vor allem in der Haut finden sich die dendritischen Zellen. Hier werden sie als Langerhanszellen bezeichnet. Sie besitzen die typischen Birbeck-Granula, wahrscheinlich Endosomen, die eine Rolle in der Antigenaufnahme und –verarbeitung spielen. Nach Antigenaufnahme wandern diese Zellen in die regionären Lymphknoten und präsentieren dort die aufgearbeiteten Antigene den T-Helferzellen. Diese werden aktiviert und setzen die eigentliche Immunreaktion in Gang.

Reife dendritische Zellen tragen eine für sie typische Kombination verschiedener Antigene auf ihrer Oberfläche. Hier finden sich CD4, CD11b, CD13 und CD33, sowie MHC-I und gleichzeitig MHC-II-Moleküle. Neben diesen typischen Antigenen finden sich je nach Reifestadium der Zellen noch andere Antigene an der Zelloberfläche der dendritischen Zellen, welche hier nicht näher benannt werden sollen [Drutman & Trombetta 2010].

1.2.6. Der Komplex Immunsystem

An der Vielzahl der hier aufgeführten Zellarten, die alle zum Immunsystem eines Menschen und auch einer Maus gehören, ist zu erkennen, dass das Immunsystem eine sehr komplexe Angelegenheit ist. Ein Eingriff in dieses empfindliche und

hochgradig vernetzte System zieht zwangsläufig Konsequenzen nach sich, die sich in ihrem Ausmaß nicht vorhersagen lassen. Als die ersten Zytostatika eingesetzt wurden, um eine Organabstoßung nach Transplantation zu verhindern, dachte man, ein Wundermittel gefunden zu haben. Jahre später traten jedoch erste Langzeitwirkungen auf, mit denen niemand gerechnet hatte. Durch die jahrelange Drosselung des Immunsystems konnten entartete Zellen nicht mehr ausreichend bekämpft werden. Die ersten Malignomerkrankungen traten bei transplantierten Patienten auf. Ein Zusammenhang konnte später in Langzeitstudien nachgewiesen werden.

Auch die Veränderung des Immunsystems bei transgenen Tieren führte teilweise zu ernststen Störungen dieses hochkomplexen Systems. So traten in der Zucht von OT-II Mäusen am Medizinisch-Experimentellen Zentrum der Medizinischen Fakultät Leipzig bei mehreren Tieren schwere Lymphomerkrankungen auf. Bei allen Beeinflussungen des Immunsystems sollte man also immer bedenken, dass man nicht ein einzelnes Merkmal eines Individuums manipuliert, sondern in ein System exakt aufeinander abgestimmter Abläufe eingreift.

1.3. Ziele dieser Arbeit

Mittelpunkt dieser Studie ist die Induktion einer ovalbuminspezifischen Immunantwort zur Etablierung eines einheitlichen Mausmodells, um in späteren Versuchen erwünschte und unerwünschte Wirkungen eines monoklonalen Anti-CD4-Antikörpers untersuchen zu können. Auch zur Erforschung anderer monoklonaler Antikörper oder neuer immunsuppressiver Therapien stellt ein standardisiertes Mausmodell mit einer reproduzierbaren Antikörperproduktion einen enormen Vorteil dar. Es bedeutet eine große Zeitersparnis für nachfolgende Forschungsgruppen und eine Verbesserung der Vergleichbarkeit bestehender und folgender Studien.

Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln erwähnt, existieren Studien sowohl über die in dieser Arbeit verwendeten Mausarten, als auch über den erwähnten Antikörper. So wurde eine Arbeit [Graca et al. 2004] veröffentlicht, in der Toleranzinduktion durch verschiedene monoklonale Antikörper (anti-CD4: YTS 177.9, anti-CD8: YTS 105.18 und anti-CD154: MR1) bei CBA-Mäusen mittels Hauttransplantation untersucht wurde. Sie zeigte, dass Mäuse, die mit allen drei Antikörpern behandelt wurden, keine Abstoßungsreaktion am Hauttransplantat zeigten.

Im gleichen Jahr erschien im „Journal of clinical and experimental Immunology“ eine Arbeit [Pohlers et al. 2004]. Sie untersuchte die Wirkung eines monoklonalen Anti-CD4-Antikörpers auf antigeninduzierte Arthritis an weiblichen C57Black6-Mäusen. Mittels des Antikörpers konnte hier ein Rückgang der klinischen Symptome, wie Gelenkschwellungen und eine Normalisierung des antigenspezifischen IgG-Titers im Blut erreicht werden.

Im „Journal of Immunology“ erschien eine Arbeit [Robertson et al. 2000] mit dem Titel „DO11.10 and OT-II T Cells Recognize a C-Terminal Ovalbumin 323-339 Epitope“. In dieser Arbeit wurden Milzzellen der beiden im Titel aufgeführten Mausarten mit Hühnerovalbuminpeptiden (Epitop 323-339) in verschiedenen Dosierungen stimuliert. Außerdem wurden Balb/c-Mäuse mit Ovalbuminlösung subcutan immunisiert und nach neun Tagen wurden die Lymphknoten entfernt, um die entstandenen T-Zellen zu untersuchen. Es konnte nachgewiesen werden, dass sowohl DO11.10- als auch OT-II-Mäuse die gleichen Epitope (323-339) auf dem Ovalbuminmolekül erkennen.

Im Hinblick auf monoklonale Antikörper erschien eine Arbeit, in der der murine anti-humanes CD4-Antikörper Max.16H5 eingesetzt wurde, um eine Toleranz gegenüber Tetanustoxin zu erzeugen [Laub 2002]. Dies gelang bei transgenen Mäusen, die ein humanes CD4-Molekül exprimieren (CD4/DR3-Mäuse).

Aus dieser kurzen Zusammenfassung der Studienlage zu Beginn dieser Arbeit wird deutlich, dass alle Gruppen verschiedene Mausarten, Immunisierungsmechanismen oder unterschiedliche Antikörper verwendeten. Ein einheitliches Tiermodell zur Erforschung der erwünschten und vor allem unerwünschten Wirkungen monoklonaler Antikörper, welches zu einer Vergleichbarkeit der einzelnen Studien führen würde, existierte trotz des klinischen Einsatzes verschiedener monoklonaler Antikörper nicht. Auf der Grundlage der oben angeführten Studien, soll im Rahmen dieser Arbeit ein standardisiertes Mausmodell mit einer reproduzierbaren Antikörperproduktion auf die Gabe einer bestimmten Antigenmenge etabliert werden. Um dies zu erreichen und außerdem eine mit der menschlichen vergleichbare Immunantwort zu bekommen, wurden die Mausarten DO11.10, OT-I und -II aus der Zucht des Medizinisch-Experimentellen Zentrum der Medizinischen Fakultät Leipzig verwendet. Das Ziel aller Versuche war, unter den genannten Mausarten ein reproduzierbares, standardisiertes Mausmodell für zukünftige Forschungen zu etablieren.

2. Materialien und Methoden

2.1. Versuchstiere

Die Versuche wurden gemäß der Genehmigung zur Durchführung von Tierversuchsvorhaben des Regierungspräsidiums Leipzig TVV-Anzeigenummer 30/14 durchgeführt. Alle Tierversuche waren gemäß § 8 Absatz 1 des Deutschen Tierschutzgesetzes genehmigt. Die Empfehlungen der tierärztlichen Vereinigung für Tierschutz e.V. wurden eingehalten. Die Versuche wurden durch Frau Dr. med. vet. Petra Madaj-Sterba überwacht.

Für die Versuche im Rahmen dieser Arbeit wurden DO11.10 T-Zell-Rezeptor transgene Mäuse mit BALB/c-Hintergrund und OT-I- und -II-Mäuse mit C57BL6-Hintergrund gewählt (Charles River Laboratories International, Inc.). Die DO11.10-Mäuse tragen einen T-Zell-Rezeptor auf einem großen Teil ihrer CD4-positiven T-Zellen, der spezielle Aminosäuresequenzen im Ovalbuminmolekül (OVA 323-339) erkennt und spezifisch an diese bindet [Robertson et al. 2000]. Die Präsenz dieses speziellen Rezeptors wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS) nachgewiesen und kontrolliert. Dieser hochspezialisierte T-Zell-Rezeptor macht es möglich, mittels Immunisierung mit einem Protein (in unseren Versuchen Hühnerovalbumin) hohe proteinspezifische IgG-Antikörper-Titer in den Mäusen zu generieren. Die Titer lassen sich sehr gut mit einem ELISA nachweisen und überwachen. Das spricht für einen späteren Einsatz als Tiermodell zur Untersuchung der Wirkung und möglichen Nebenwirkungen des Anti-CD4-Maus-Antikörper GK 1.5.

Alle Tiere wurden im Medizinisch-Experimentellen Zentrum der Medizinischen Fakultät Leipzig gezüchtet, die Elterntiere stammten aus den Charles River Laboratories International, Inc..

Für die Versuche wurden beide Geschlechter im Alter zwischen sieben und dreißig Wochen verwendet alle Tiere wurden im Tierstall des MEZ der Universität Leipzig gehalten und mit speziellem Futter (Haltungsfutter V1534-0, Zuchtfutter V1124-0 Fa. Sniff) ernährt. In einem Käfig (Käfig Typ II: Bodenfläche 363cm², PC Polycarbonat, Makrolon mit Standard-Edelstahldeckel; Fa. Ehret GmbH) saßen maximal 4 Mäuse zusammen. Nicht miteinander verwandte Männchen mussten einzeln gehalten werden, da sich die männlichen Tiere untereinander sehr aggressiv verhielten. Nicht

miteinander verwandte Weibchen hingegen konnten problemlos in Gruppen gehalten werden. Die Identifikation der Mäuse erfolgte über eine Ohrlochcodierung.

Weitere in dieser Arbeit untersuchte transgene Mäuse sind die OT-I- und OT-II-Mäuse. Die Versuche wurden gemäß der Genehmigung zur Durchführung von Tierversuchsvorhaben des Regierungspräsidiums Leipzig TVV-Anzeigenummer V 5/06 nach §10a Tierschutzgesetz mit dem Titel Immunisierung, Serum und Organgewinnung (DO-OT2-Ttg-06) durchgeführt. Sie tragen einen ebenfalls transgenen T-Zell-Rezeptor, der spezifisch an bestimmte Aminosäuresequenzen im Ovalbuminmolekül bindet. Die OT-I-Mäuse tragen diesen Rezeptor auf den CD3+CD8+-zytotoxischen T -Zellen. Bei den OT-II-Mäusen findet er sich auf CD3+CD4+-T-Helferzellen [Robertson et al.,2000]. Auch diese Tiere stammen aus der Zucht im Medizinisch-Experimentellen Zentrum der Medizinischen Fakultät Leipzig (Elterntiere wurden erworben von den Charles River Laboratories International, Inc.: C57BL/6-Tg(Tcra Tcrb)1100MjbJ (OT-1), B6.Cg-Tg(TcraTcrb)425Cbn/J (OT-II)).

2.2. Reagenzien

Ovalbumin

Das in diesen Versuchen verwendete Ovalbumin ist ein vollständiges Hühner-ovalbuminmolekül in Pulverform, hergestellt von SIGMA (Albumin, CHICKEN EGG, Grade V: Minimum 98 %; EC No 232-692-7). Es wird im Kühlschrank bei etwa 5 Grad Celsius gelagert. Bei der Verarbeitung dieses Stoffes müssen aufgrund des hohen allergenen Potentials Handschuhe getragen werden.

Aluminiumhydroxid-Adjuvans

Um die Immunantwort der Versuchsmäuse zu verbessern, wurde das Ovalbumin an ein Adjuvans gekoppelt. Für diese Versuche wurde Aluminiumhydroxid ausgewählt, da dieses Adjuvans schon seit 1926 eingesetzt und seit 1938 in Impfstoffen der Humanmedizin (zum Beispiel gegen Diphtherie und Tetanus) Anwendung findet. Durch Aluminiumhydroxid-Adjuvans wird eine TH₂-Antwort ausgelöst und damit eine

verstärkte IgG₁- und IgE-Antwort und eine verstärkte Antikörperproduktion der B-Zellen verursacht.

Die Aluminiumhydroxid (Al(OH)₃)-Lösung wurde vor jedem Versuch im Labor aus Aluminiumkaliumdisulfat (Pulver, Fa. Merck) neu hergestellt. Der erste Schritt bestand in der Herstellung einer zehnprozentigen Aluminiumhydroxidlösung. Zur Erzeugung dieser Lösung wurden 10 g Aluminiumkaliumdisulfat (AlK(SO₄)₂ x 12 H₂O) in 100 ml aqua destillata gelöst. Dies erfolgte unter vorsichtigem Erwärmen und langsamen Rühren mittels Magnetrührer (MR 3002, Fa. Heidolph). Die Prozedur dauerte etwa eine Stunde. Anschließend füllte man die Lösung in einen Messkolben und filtrierte sie über einen Spritzenfilter (Fa. Schleicher und Schill) mit einer Porengröße von 0,2 µm steril. Die Lösung konnte etwa ein Jahr in einem Glasbehälter aufbewahrt werden.

Für die nächsten Schritte wurden steriles aqua destillata und sterile 0,9 prozentige Natriumchloridlösung (Herstellung aus Natriumchlorid der Fa. Merck) benötigt. Beides wurde im laboreigenen Autoklaven (Hiclave HV 110, Fa. Universal Labortechnik) immer zu Beginn der Versuche sterilisiert.

Für die Herstellung der Ovalbuminlösung wurde die Menge des Ovalbumin berechnet, die man für den anschließenden Versuch benötigte. Diese wurde auf einer Feinwaage (Fa. Kern, Modell 770) abgewogen und dann in 0,9 prozentiger Natriumchloridlösung gelöst, so dass am Ende 1 ml Lösung 1 mg Ovalbumin enthielt. Die Ovalbuminlösung wurde dann 5 bis 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach über einen Spritzenfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm von Hand steril filtriert.

Zur Herstellung des Aluminiumhydroxid-Adjuvans benötigte man weiterhin 0,25-normale Natriumhydroxid-Lösung. Diese wird aus einmolarem Natriumhydroxid gewonnen, welches im Verhältnis 1 zu 4 mit sterilem aqua destillata verdünnt wurde. Von dieser Lösung wurden 22,8 ml benötigt, die tropfenweise unter Rühren oder Vortexen (Vortex: Vertex Genie 2, Fa. Scientific Industries) in ein 50-ml-Schraubdeckelröhrchen (Blue Cap) gegeben wurden, in dem sich 10 ml einer zehnprozentigen Aluminiumhydroxid-Lösung befanden. Anschließend inkubierte die Lösung unter permanentem Rühren 10 Minuten bei Raumtemperatur.

Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Blue Cap bei 1000xg in einer Zentrifuge des Modells Rotina 48 RS (Fa. Hettich) mit Ausschwingrotor für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in sterilem aqua dest gelöst. Die

Lösung gaben wir in einen Messzylinder und füllten ihn auf 50 ml mit sterilem aqua dest auf.

Der letzte Schritt war die Beladung des Aluminiumhydroxid-Adjuvans mit Ovalbumin. Hierfür trennte man die Aluminiumhydroxid-Lösung je nach gewünschter Menge in zwei Anteile und füllte sie in Blue Caps ab. Der eine Anteil wurde mit Ovalbumin beladen, indem man die zuvor vorbereitete Ovalbuminlösung mit der Aluminiumhydroxid-Lösung mischte und leicht schwenkte. Der andere Anteil wurde nicht beladen und diente als Reagens für die Kontrollgruppe. Die beiden Lösungen wurden bei 1000xg in der oben angeführten Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in der sterilen Natriumchloridlösung aufgelöst. Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten bei Raumtemperatur. Dabei war es erforderlich, dass die Blue Caps intermittierend vorsichtig geschwenkt beziehungsweise gevortex wurden.

Anschließend wurde die Lösung in Eppendorf – Zentrifugenbehälter mit einem Volumen von 2 ml umgefüllt, welche anschließend bei 10000xg in einer Eppendorf 5415D – Zentrifuge für 10 Minuten zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde abpipettiert und bis auf einen kleinen Teil verworfen. Diesen Teil benötigte man für den Bradford Assay, mit dem der Proteingehalt des Überstandes kontrolliert wurde.

Das Pellet löste man entsprechend der angesetzten Menge in steriler Natriumchloridlösung, wobei das Ziel eine Endkonzentration von 2 mg Ovalbumin in 1 ml Natriumchloridlösung war (Beispiel: bei einer Menge von 8 mg Ovalbumin in 8 ml Natriumchloridlösung wurde am Ende das Pellet in 4 ml Natriumchloridlösung gelöst).

Das mit Ovalbumin beladene $\text{Al}(\text{OH})_3$ wurde bei -80 Grad Celsius (Schrack der Fa. Heraeus) in 2 ml Eppendorf - Zentrifugenbehältern gelagert und nach dem Auftauen der Proteingehalt mittels eines Bradford-Assay überprüft. Unsere Ergebnisse zeigten, dass es auch nach einem Monat Lagerungszeit zu keinem signifikanten Proteinverlust kommt.

Vor der Gabe an die Tiere wurde die aufgetaute Ovalbumin-Aluminiumhydroxid-Lösung entsprechend den vorher angestellten Berechnungen für jede Tiergruppe mit steriler Natriumchloridlösung verdünnt, um die vor dem Versuch festgelegte Immunisierungsmenge zu erhalten. Allerdings wurde die Lösung ab einer Konzentration von 500 µg Ovalbumin in 250 µl Lösung sehr zähflüssig, so dass man sie nur schwer mit den Spritzen aufziehen beziehungsweise applizieren konnte.

Schon aus diesem Grund ist die höchstmögliche Applikationsmenge begrenzt. Die ab Versuch 2 verwendete Maximalkonzentration von 250 µg Ovalbumin in 250 ml Lösung lässt sich problemlos aufziehen und auch applizieren.

Zur Injektion wurden BD Plastipack-Spritzen mit einem Volumen von 1 ml (pyrogenfrei, LOT 010630) verwendet mit Kanülen der Firma Braun (Sterican Einmal-Insulin-Kanüle mit einem Durchmesser von 0,4 x 12 mm, 27 G x 0,5; LOT 01E0882511).

2.3. Proteinbestimmung nach Bradford

Für den Bradford Assay wurde Bio Rad Proteinassay – Lösung (Konzentrat) verwendet. Diese musste vor ihrem Einsatz im Verhältnis 1 zu 5 mit aqua destillata verdünnt werden.

Von den Proben wurden 5 µl in jeweils ein well einer ELISA-Platte pipettiert. Auf die Probe gab man pro well 250 µl verdünnte Bio Rad-Reagenz und ließ die Mischung für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Danach wurde die Probe in einem Spectrometer (Sunrise, Fa. Tecan) bei 595 nm gemessen.

Mit diesem Assay kann die Menge von freien und gebundenen Proteinen gemessen werden, die sich in einer Lösung befindet. In Bezug auf diese Arbeit diente der Assay dazu, die Menge Ovalbumin zu bestimmen, die sich gemeinsam mit dem Aluminiumhydroxid-Adjuvans in Lösung befindet. Das war notwendig, um die Berechnungen der gebundenen Proteinmenge im Vorfeld der Versuche zu überprüfen und um Verluste des Proteins nach längerer Lagerung zu bestimmen und diese gegebenenfalls korrigieren zu können.

Außerdem wurde der Überstand des letzten Zentrifugationsschrittes auf Protein untersucht, um festzustellen, ob das gesamte Ovalbumin an Aluminiumhydroxid gebunden hat oder ob noch Teile des Proteins im Überstand verblieben waren. Es gab während der Versuche keinen Überstand, in dem sich Protein befunden hat. Das bedeutet, dass die komplette Menge des gelösten Ovalbumin an das Aluminiumhydroxid-Adjuvans gebunden hat.

2.4. Durchführung von ELISAs

Der ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ist ein immunologisches Nachweisverfahren zum Nachweis spezifischer Moleküle in einer Lösung durch geeignete Antikörper und nachfolgende enzymatische Reaktion und photometrische Messung.

Die Bestimmung der IgM- und IgG-Titer erfolgte über einen Sandwich-ELISA. Als Beschichtungspuffer wurde ein 0,1 molarer Natriumbicarbonatpuffer (NaHCO_3 , Fa. Merck) verwendet. Weiterhin kamen ein Assaypuffer (phosphate buffered saline pH 7,4 mit 10 % fetalem Kälberserum, Fa. Gibco) zum Einsatz, sowie ein Waschpuffer (phosphate buffered saline pH 7,4 mit 0,2 % Tween 20 der Fa. Serva und 0,01 % Natriumazid der Fa. Merck). Als Detektions-Antikörper wurden ein biotinilierter polyklonaler Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper (CALTEG M30015; 1,25mg/ml) in Assaypuffer 1:20.000 und ein biotinilierter Hase-anti-Maus-IgM-Antikörper (DAKO # E 0465) in Assaypuffer 1:20.000 verwendet. Die Proben waren die Mäuseseren, die aus den Blutentnahmen gewonnen wurden, welche während der Versuche durchgeführt wurden. Außerdem kam ExtrAvidin/Alkalische Phosphatase (Sigma) in einer Verdünnung von 1:2000 zum Einsatz, welches eine sehr hohe Affinität bezüglich des Biotins aufweist. Als Substrat der alkalischen Phosphatase wurde im ELISA p-Nitrophenylphosphat (Fa. Serva) verwendet.

Die ELISA-Platten der Firma Nunc (MaxiSorp) wurden über Nacht bei 4 Grad Celsius mit dem Beschichtungsantigen Ovalbumin im Verhältnis 1 µg pro ml Beschichtungspuffer inkubiert (100 µl pro well). Der zweite Schritt war ein Waschvorgang, indem jedes belegte well dreimal mit 350 µl Waschpuffer gespült wurde. Die Blockung erfolgte mit 360 µl Assaypuffer pro well für eine Stunde bei Raumtemperatur (dritter Schritt). Danach wurden je 50 µl Assaypuffer und 50 µl Probe in ein well gegeben und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert (vierter Schritt). Nach Ablauf der Zeit wusch man die wells viermal mit 350 µl Assaypuffer (fünfter Schritt). Als sechsten Schritt gab man 100 µl Detektionsantikörper (siehe oben) in jedes well und ließ ihn 2 Stunden bei Raumtemperatur reagieren. Es folgte ein weiterer Waschvorgang (siebter Schritt), in welchem jedes well erneut viermal mit 350 µl Assaypuffer gewaschen wurde. Nun wurden 100 µl Extravidin/AP in jedes well gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (achter Schritt). Der neunte

Schritt war der letzte Waschvorgang. Hier wurde jedes belegte well achtmal mit 350 µl Waschpuffer gewaschen. Zuletzt wurde das Substrat (100 µl pro well) zugegeben und dreißig Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert (zehnter Schritt). Nach den 30 Minuten kamen die ELISA-Platten zum Messen in ein Spectrometer (Fa. Tecan) und wurde bei 405 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen.

Um eine Standardisierung zu erreichen, wurde ab Versuch 2 bei jedem ELISA eine Verdünnungsreihe mit einem IgM-Maus-anti-Ovalbumin-Antikörper (TEPC183) und einem IgG1-Maus-anti-Ovalbumin-Antikörper (Max16H5) mitgeführt. Diese Verdünnungsreihe wurde analog der Beschreibung des ELISA durchgeführt. Allerdings erfolgte die Beschichtung der ELISA-Platten gleich mit dem IgM- oder IgG1-Maus-anti-Ovalbumin-Antikörper statt mit Ovalbumin. Außerdem wurde anstelle einer Serumprobe Assay-Puffer verwendet. Aus den erhaltenen Werten wurde eine Kurve (Standardkurve) erstellt. Auf der X-Achse werden die Konzentrationen vom IgG1-Maus-anti-Ovalbumin-Antikörper aufgetragen und auf der Y-Achse findet man die OD-Werte.

Mit Hilfe dieser Kurve konnte für jede Probe anhand des OD-Wertes die entsprechende Antikörperkonzentration relativ ermittelt werden (KO-OD-Wert) und Störfaktoren eliminiert werden. Die Antikörperkonzentration konnte später mit den Konzentrationen anderer Proben aus anderen Versuchen besser verglichen werden.

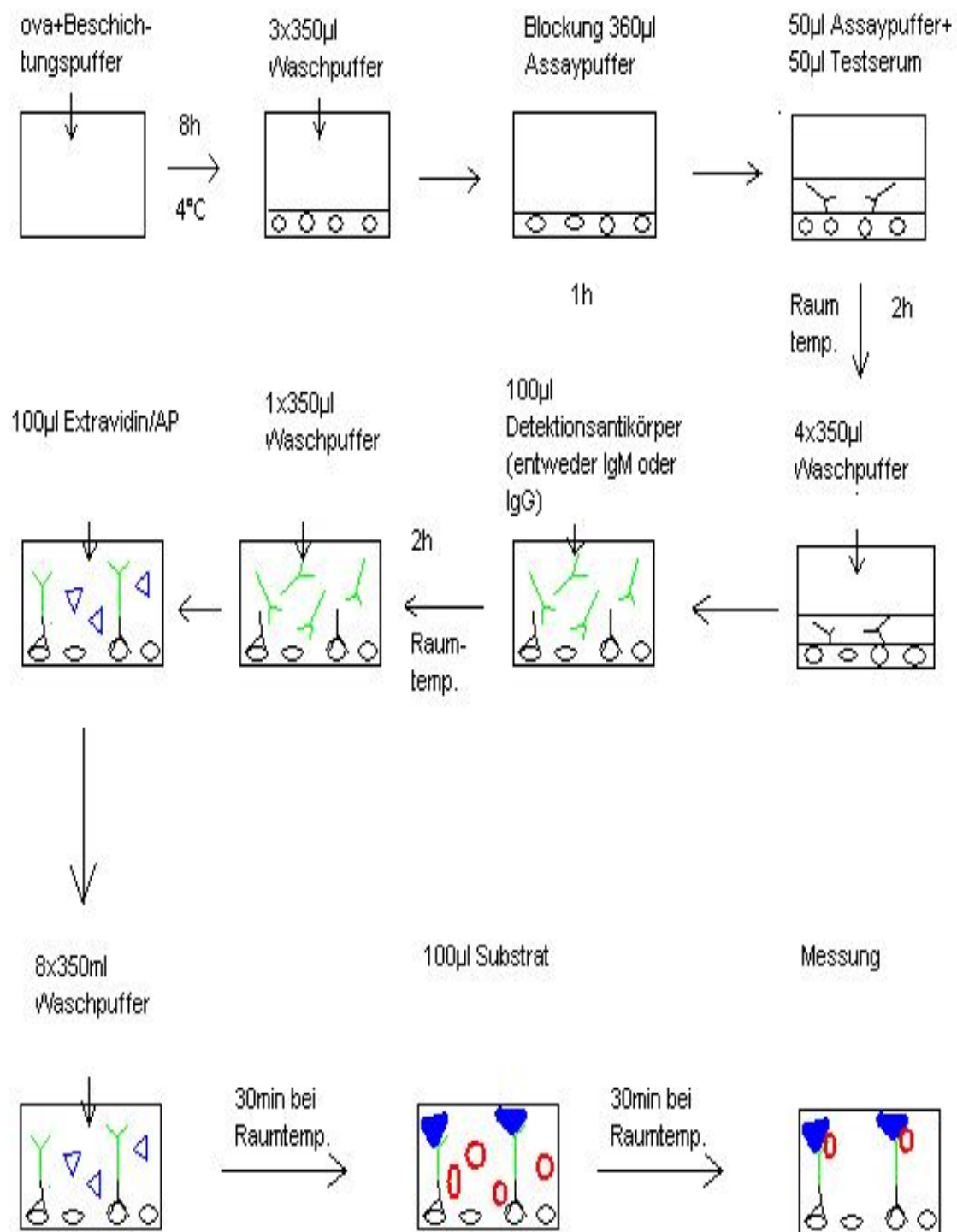


Abbildung 2.2.1.: Hier ist der im Kapitel zwei beschriebene Ablauf des ELISA dargestellt.

2.5. Durchflusszytometrie

Präparation von Milz, Thymus und Lymphknoten

Die Mäuse wurden gemäß den aktuellen Tierschutzbestimmungen mit CO₂-Gas getötet. Anschließend wurden mittels sterilem mikrochirurgischen Instrumentarium die Bauchorgane durch eine mediane Laparotomie entfernt. Die Instrumente wurden nach Eröffnung des Abdomens gewechselt, um die Sterilität zu gewährleisten. Zuerst wurde die Milz, die sich im linken Oberbauch oberhalb des Dünndarmes befindet entfernt. Anschließend folgte die Präparation der intestinalen, inguinalen, sacralen und axillären Lymphknoten (insgesamt 24 Lymphknoten) teilweise mittels Mikroskop (Stereomikroskop Fa. Zeiss). Man erkennt die Lymphknoten an ihrer gräulichen Färbung und ihrer etwas festeren Konsistenz im Vergleich zum umliegenden Fettgewebe.

Nach der Entfernung aus dem Situs wurden die Milz und die Lymphknoten in ein mit 20 ml beziehungsweise 10 ml eisgekühltem Waschmedium befülltes 50 ml-Blue Cap gegeben. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Organe nun auf Eis gelagert.

Herstellung einer Zellsuspension

Die weitere Verarbeitung der Organe erfolgte unter der Sterilbank (HeraSafe, Fa. Heraeus). Es wurde je ein Zellstrainer (Fa. Becton Dickinson) auf ein geöffnetes Blue Cap gesetzt und das Organ mit dem Medium auf das Nylonnetz gegeben. Das betreffende Organ wurde nun mit einem sterilen 2 ml-Kunststoffspritzenstempel (Fa. Becton Dickinson, Discardit II) durch den Zellstrainer gedrückt. Das Netz des Strainers wurde dabei ständig mit Waschmedium gespült, um so viele Zellen wie möglich zu erhalten und eine Austrocknung der Zellen zu verhindern. Nach diesem Schritt wurden die Zellen zentrifugiert bei 338xg und vier Grad Celsius für 6 Minuten (Waschschritt). Das Pellet der Milzzellen wurde resuspendiert, ca. eine Minute und 20 Sekunden in 10 ml Erythrozyten-Lysis-Puffer und danach in ein mit 40 ml Waschmedium (Fa. Gibco) befülltes 50 ml Blue Cap überführt. Das im Medium enthaltene FCS stoppte die weitere Lyse der Leukozyten. Es folgten zwei Waschschritte mit je 35 ml Waschmedium zur vollständigen Entfernung des Erythrozyten-Lysis-Puffers. Das nun gereinigte Zellpellet wurde in 20 ml

Waschmedium aufgenommen und für die weitere Verarbeitung auf Eis gekühlt gelagert. Bei dem Lymphknotenzellpellet konnte die Resuspension im Erythrozyten-Lysis-Puffer weggelassen werden, da in den Lymphknoten keine Erythrozyten vorkommen. Das einmalige Waschen mit dem Waschmedium war ausreichend. Die weitere Verarbeitung entspricht dem Vorgehen bei der Milz.

Bestimmung der Zellvitalität

Mikroskopische Analyse mittels Trypanblau-Färbung

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl und der Zahl toter und lebender Zellen erfolgte mit der NEUBAUER-Zählkammer. Hierfür wurde der Zellsuspension eine Probe entnommen und im Verhältnis 1 zu 2 mit Trypanblau (0,1 %) verdünnt. Der Azofarbstoff Trypanblau (Fa. Servo) diente als Vitalitätsmarker der Zellen, da er durch die beschädigte Zellmembran der toten Zellen eindringt und an Proteine im Zellplasma bindet, wodurch es zu einer Blaufärbung der toten Zellen kommt. Die Zahl ungefärbter Zellen in einem Großquadrat der Zählkammer wurde mit 10^4 und dem Verdünnungsfaktor 2 multipliziert. Es ergibt sich die Lebendzellzahl/ml der Zellsuspension. Die Anzahl der toten Zellen wurde äquivalent ermittelt.

Bestimmung der Zellvitalität durch Annexin V-Propidiumiodid-Färbung

Nach Induktion der Apoptose kommt es zu einer Aufhebung der Phospholipidasymmetrie der Zellmembran. In einer vitalen Zelle liegt Phosphatidylserin auf der Innenseite der Zellmembran, nach Induktion der Apoptose wird es auf die Außenseite der Zellmembran transportiert. Hier ist der Angriffspunkt der Annexin V-Färbung, welches Phosphatidylserin bindet. So können die apoptotischen Zellen in der Durchflusszytometrie mittels eines an Annexin V gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffes nachgewiesen werden. Um die bereits toten Zellen trennen zu können, welche ebenfalls Annexin V binden, erfolgte eine Färbung mit Propidiumiodid, das mit der DNS und RNS toter Zellen interkaliert. Vitale Zellen lassen sich durch keinen der beiden Farbstoffe anfärben. Zur Bestimmung des Anteils der vitalen Zellen im Lymphozytenpool wurden mind. 1×10^5 Zellen mit 3 ml PBS (Zentrifugation bei 338xg und 4 Grad für 5 Minuten). Nach Resuspendieren der Zellen mit 100 μ l Binding Buffer wurden 5 μ l Annexin-V plus Fluoreszenzfarbstoff

(zum Beispiel Fluorescein-Isothiocyanat FITC) und 2 µl Propidiumiodid (Endkonzentration: 50 µg/ml) dazugegeben.

Bei jedem Ansatz wurden Kontrollen mit unmarkierten und jeweils nur mit Annexin V- oder Propidiumiodid-markierten Zellen mitgeführt. Das Gemisch wurde im Dunkeln 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden zu dem Gemisch zweihundert Mikroliter Binding Buffer pipettiert. Um ein Absterben der Zellen durch die zytotoxische Wirkung des Propidiumiodid zu verhindern, musste die Messung unmittelbar nach der Färbung erfolgen.

Antikörper

Zur Untersuchung der T-Zellen in Blut, Thymus und Milz der OT-Mäuse wurden entsprechende monoklonale Antikörper benötigt. Sie wurden für diesen Versuch gemischt. Nach der Kopplung an die Zelle konnten sie mit Hilfe des FACS-Gerätes untersucht werden. Hierfür wurden 3 verschiedene Färbungen verwendet (PE, CY5 und FITC). Diese wurden in Diagrammen gegeneinander aufgetragen. Ziel ist, den Anteil einzelner Zellgruppen an der Gesamtzahl der gemessenen Zellen zu ermitteln.

Bestimmung der Expression von Zellembanmolekülen

Um einzelne Zellpopulationen in Milz, Lymphknoten und Blut identifizieren zu können, werden für diese Populationen spezifische Oberflächenmoleküle mit fluoreszierenden Antikörpern besetzt. Deren Signale werden anschließend in durchflusszytometrischen Analysen identifiziert und separiert.

Für die FACS-Analyse wurden 50 µl Zellsuspension (ein bis $2,5 \times 10^5$ Zellen) in ein FACS-Röhrchen (Fa. Sarstadt) gegeben, die jeweils benötigten Antikörper (verdünnt in FACS-PBS als Cocktail mit mehreren festgelegten Antikörpern) oder die entsprechenden Isotypenkontrollen wurden zugegeben und das Gemisch für 15 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Die Isotypenkontrollen wurden in der gleichen Menge der entsprechenden Antikörper zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen mit 3 ml FACS-PBS und bei 338xg und 4 Grad Celsius 6 Minuten lang zentrifugiert (Varifuge Fa. Heraeus).

Der Überstand wurde verworfen und danach das Pellet in 100 µl FACS-PBS gelöst. Die Messung erfolgte am FACScan® (Becton Dickinson).

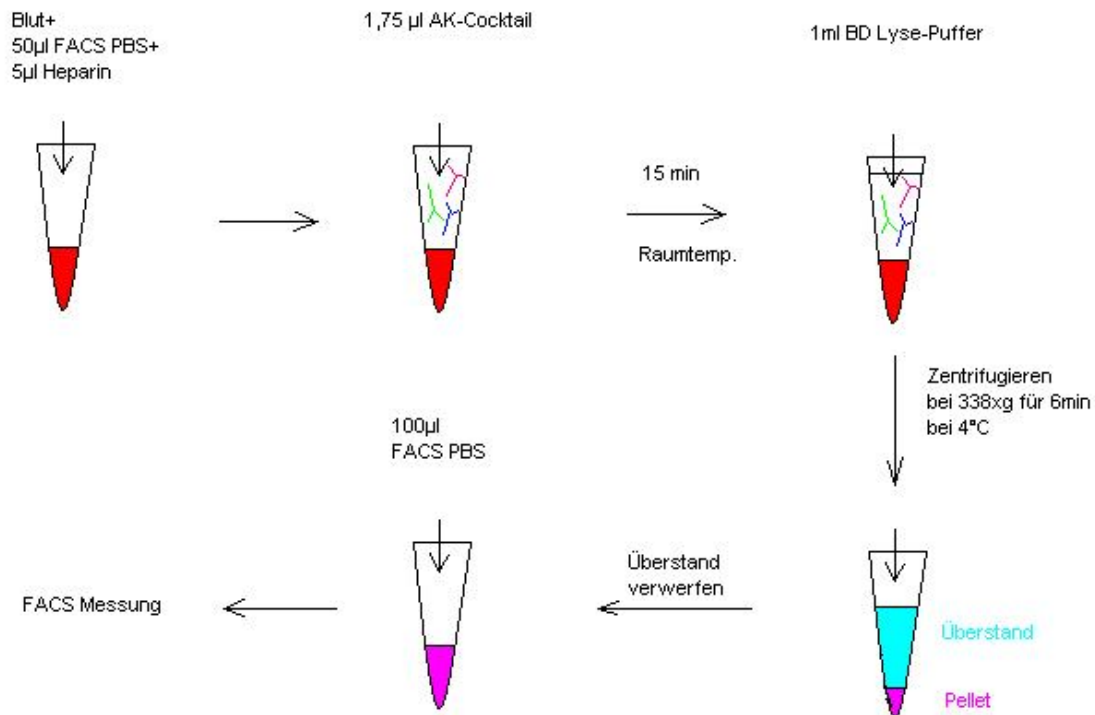


Abbildung 2.5.1.: Darstellung der Vorbereitungen der Proben für die FACS-Analyse anhand einer Blutprobe.

Durchflusszytometrische Analyse

Mittels Durchflusszytometrie ist es möglich, Zellen gleichzeitig auf verschiedene Parameter (zum Beispiel Zellgröße, Expression von Oberflächenmolekülen) zu untersuchen. Die Zellen werden durch eine Kapillare gedrückt, in Einzelzellsuspension gebracht und an einem Laserstrahl (Argonlaser 488 nm) vorbeigeleitet. Gemessen wird sowohl das emittierte, als auch das gestreute Licht durch Photodetektoren. Es werden zwei verschiedene Größen gemessen. Die Vorwärts-Lichtstreuung korreliert dabei mit der Größe der Zellen, die seitliche Lichtstreuung ist ein Maß für das Plasma-Kern-Verhältnis. Zur Markierung der Zellen werden verschiedene monoklonale Antikörper verwendet, an die bestimmte Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorochrome) gebunden werden. Der Farbstoff Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) besitzt ein Absorptionsmaximum von 495 nm. Wird er bei 488 nm angeregt, strahlt er ein energieärmeres Fluoreszenzlicht (Emissionsmaximum

525 nm) aus, das als Grünfluoreszenz im FL1-Detektor gemessen wird. Der zweite Farbstoff ist Phycoerythrin (PE). Er weist ein Absorptionsspektrum von 564 nm auf. Nach Anregung bei 488 nm strahlt er eine Orange-Rot-Fluoreszenz im FL2-Detektor aus (Emissionsmaximum 576 nm). Der dritte Farbstoff ist synthetisch hergestellt und nennt sich PE-Cy5 (Tandem-Fluorochrom). Angeregt bei 488 nm strahlt er mit einem Emissionsmaximum von 670 nm im FL3-Detektor. Die Fluoreszenzintensität korreliert dabei mit der Antigendichte auf der Zelloberfläche. Die Messung der fluoreszenzmarkierten Zellen erfolgte am FACScan® mit Hilfe der „CellQuest“-Software (Becton Dickinson). Entsprechend der Vorwärts- und Seitwärtsstreuung wurde ein Analysenfenster für Lymphozyten (Lymphogate) mit einem Schwellenwert zum Ausschluss von Zelltrümmern gesetzt. Bei Färbungen mit 2 oder 3 Farbstoffen werden einfach gefärbte Proben zur Kompensation der überlappenden Spektren verwendet. Die Spezifität der gemessenen Intensitäten wurde mit Isotypkontroll-Antikörpern nachgewiesen. Je Probe wurden ca. 5000 bis 10000 Zellen entsprechend den Fluoreszenzsignalen der Isotypkontrollen und den Ergebnissen der Einzelfärbungen analysiert. Die Anzahl der gefärbten Zellen wurde aus der Quadranten-Statistik der erstellten Dot-Blots ermittelt. Außerdem wurde mit Hilfe des CellQuest-Programms die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) aus der Histiogrammstatistik ermittelt.

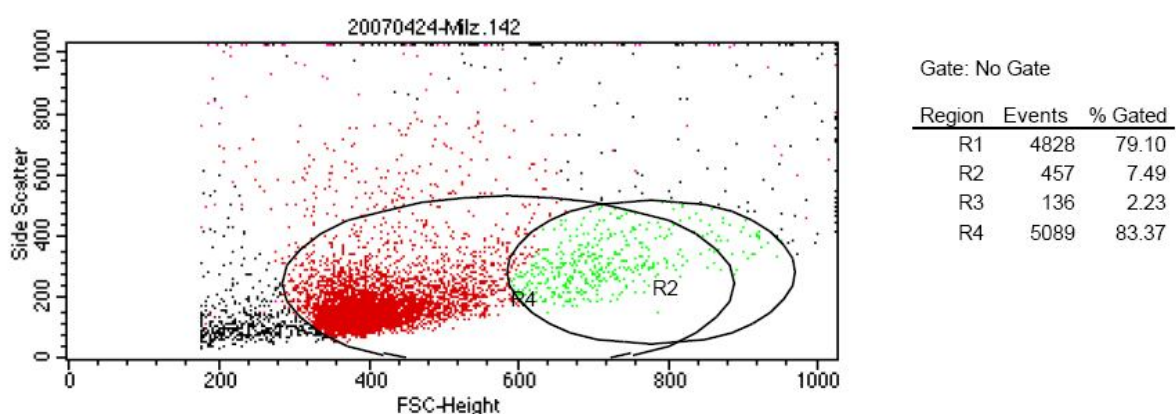


Abbildung 2.5.2.: Beispiel einer FACS-Analyse des FACScan®.

Tabelle 2.5.1: Darstellung der verwendeten Farbstoffe

Standardfilter (nm)	Fluorochrome	Filter
Blau 488nm	FITC (Fluorescein-5-isothiocyanat)	525 nm
	PE (Phycoerythrin)	576 nm
	PE-Cy5 (Tandem-Konjugat)	670 nm

2.6. Versuchsaufbau

2.6.1. Immunisierung mit Ovalbumin

Die Immunisierung erfolgte mit Hühnerovalbumin (vollständiges Molekül) in Konzentrationen zwischen 25 µg und 1500 µg. Eine tabellarische Darstellung findet sich in den Anlagen, Tabelle 2. Um die immunogene Wirkung zu erhöhen, wurde das Protein wie oben beschrieben an Aluminiumhydroxid-Adjuvans gekoppelt (siehe auch Kap. 2.2 Materialien und Methoden). Die Versuchsmäuse wurden in verschiedene Gruppen eingeteilt. Die beiden Kontrollgruppen erhielten entweder Aluminiumhydroxid in physiologischer Natriumchloridlösung oder reine physiologische Natriumchlorid-lösung. Im Gegensatz dazu bekamen die anderen Versuchsgruppen Ovalbumin in verschiedenen Konzentrationen gespritzt. Die Applikation von insgesamt 250 µl Lösung pro Maus erfolgte intraperitoneal. Dafür wurden Spritzen der Firma BD Plastipack (1 ml/LOT 010630) benutzt mit Kanülen der Firma B. Braun (Sterican; Durchmesser 0,4x12 mm; LOT 01E0882511)

Vor der ersten Immunisierung, vor jeder Blutabnahme und vor der Boosterung wurden alle Mäuse gewogen, die Gewichte notiert und sowohl während als auch am Ende des Versuches miteinander verglichen, um eventuelle Zustandsverschlechterungen der Tiere zeitnah erkennen zu können. Die Blutentnahmen erfolgten an den Tagen 0 (direkt vor der Immunisierung), 3 und 6 nach der Immunisierung sowie direkt vor und am Tag 6 nach der Boosterung.

Die Blutentnahme erfolgte aus dem retrobulbären Plexus mit heparinisierten Kapillaren. Die blutgefüllten Kapillaren wurden in mit der Mausnummer gekennzeichnete Eppendorf – Zentrifugenbehälter ausgeblasen und diese verschlossen. Um Infektionen zu vermeiden und die Wundheilung zu beschleunigen, wurde das betroffene Auge einmalig nach der Blutentnahme mit einer antibiotikum-

und dexpanthenolhaltigen Salbe behandelt. Nach der Blutentnahme wurden die Mäuse in ihre mit Papier ausgelegten Käfige gesetzt. Damit wurde ein Kontakt des Auges mit der Einstreu vermieden. Die betroffene Seite wurde notiert und bei der folgenden Blutentnahme wurde das Auge der anderen Seite gewählt, um eine Ausheilung der retrobulbären Wunde zu erreichen.

Für die intraperitoneale Injektion der Reagenzien war keine Anästhesie erforderlich. Die Einstichstelle befindet sich zwischen den hinteren Extremitäten im Abdominalbereich. Zur Applikation wurde die Maus im Nacken mit zwei Fingern fixiert und mit den anderen Fingern am Rücken festgehalten. Um Darm- beziehungsweise Organverletzungen durch die Nadel zu vermeiden, erfolgte der Einstich in Kopftieflage (Organe rutschen nach cranial). Nach der Injektion wurden die Tiere wieder zurück in ihre Käfige gesetzt. Eine spezifische Überwachung war nicht erforderlich.

Die Blutproben wurden im Anschluss an die Blutentnahme, beziehungsweise an die Immunisierung, umgehend im Labor verarbeitet. Sie wurden in einer Eppendorf 5415D-Zentrifuge bei 2000 Umdrehungen dreimal zentrifugiert. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurde das Serum abpipettiert und das Pellet im Kühlschrank bis zum Ende der Verarbeitung aufbewahrt. Das Serum wurde entweder sofort nach dem Zentrifugieren untersucht oder bei -20 Grad in 0,5 ml Eppendorf-Zentrifugenbehältern eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt verarbeitet.

2.6.2. Untersuchung der OT-Tiere

Für diesen Versuch wurden das Blut, der Thymus und die Milz von insgesamt 38 Tieren untersucht. Bei jedem Tier wurde eine Kontrolle mitgeführt. Die drei Organe wurden getrennt voneinander untersucht. Bei jedem Tier wurden für jedes Organ 2 verschiedene Antikörperkombinationen (Tube 2 und 3) getestet. Außerdem wurde bei den ersten 13 Tieren eine zusätzliche Antikörperkombination (Tube 4) angewendet. Während der Untersuchungen wurde bei den Proben eines jeden Tieres eine Kontrollgruppe mitgeführt (Tube eins), um mögliche Fehler auszuschließen. Die 3 anderen Tubes enthielten definierte Antikörperkombinationen (Tabelle 2.6.2.1). Im zweiten Tube wurden anti-CD3-, -CD4- und CD8-Antikörper eingesetzt. Das 3. Tube enthielt anti-CD4-, -CD8- und -TCR-Antikörper (Tabelle 2.6.2.2). An die genannten Antikörper sind definierte Farbstoffe gekoppelt, die von einem FACScan® erkannt

werden können. So kann anhand der Anteile der verschiedenen Farben am Gesamtspektrum die Häufigkeit der der Farbe zugeordneten Zellart ermittelt werden. Das Ergebnis dieser Messung ist der Anteil bestimmter Zellpopulationen mit definierten Oberflächenmarkern an der Gesamtzahl der gemessenen Zellen.

Tabelle 2.6.2.1: Überblick über die verwendeten Antikörper und Färbungen bei der FACS-Analyse.

Antikörper	Färbung	Hersteller
amCD3	FITC	CELLLAB
amTCRValpha2	FITC	BD
amCD4	PE	BD
amCD8	PE	Caltag
amCD8	PeCy5	BD
amCD4	Tricolor	Caltag

In Spalte Eins sind die Bezeichnungen der Antikörper aufgeführt, in Spalte Zwei ist die entsprechende Färbung zugeordnet. In Spalte 3 sind die zugehörigen Hersteller benannt.

Tabelle 2.6.2.2: Verwendete Antikörperkombinationen und Mengenangaben für die FACS-Färbung.

Tube 2	amCD3 FITC amCD4 PE amCD8 PECy5	1 µl 0,25 µl 0,125 µl
Tube 3	amTCRValpha2 FITC amCD8 PE amCD4 Tricolor	0,025 µl 1 µl 0,1 µl

2.7. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit den Programmen SPSS-Statistics (IBM, München) sowie Minitab (Additive, Friedrichsdorf). Beides sind Software-Pakete, mit deren Hilfe eine statistische Auswertung von Daten erfolgen und gegebenenfalls eine graphische Darstellung erfolgen kann. In dieser Arbeit wurden verschiedene Möglichkeiten der graphischen Darstellung genutzt. Daten wurden in Balken- oder Streudiagrammen dargestellt, welche für den Betrachter die ausgewerteten Daten übersichtlich darstellen. Eine weitere Darstellungsform ist der Boxplot. Die „Box“ stellt

die Daten dar, die zwischen der 25. und 75. Perzentile liegen. Zwischen der sogenannten „Whiskers“, der oberen und unteren Begrenzung liegen 100 % der ausgewerteten Daten. Der Boxplot lässt Rückschlüsse auf die Datenvariabilität zu. Der ebenfalls verwendete Dotplot ist ein eindimensionales Streudiagramm, die Daten werden lediglich auf einer Diagrammachse dargestellt.

Zur Auswertung der Daten wurde der Mood-Median-Test verwendet. Dies ist ein nicht parametrischer Test zum Vergleich der Medianwerte voneinander unabhängiger Stichproben. Ein zweiter genutzter Test ist der T-Test. Der T-Test liefert nur für intervallskalierte Daten zuverlässige Informationen, er gehört zu der Gruppe der parametrischen Verfahren. Parametrische Verfahren schätzen Populationsparameter mittels parametrischer Kennwerte, wie dem arithmetischen Mittel, für deren Berechnung die Intervallskaliertheit der Daten Voraussetzung ist. Der ANOVA-Test ist eine univariate Varianzanalyse. Er untersucht den Einfluß einer Variablen auf eine andere abhängige Variable.

3. Ergebnisse

3.1. Einfluss der applizierten Ovalbuminmenge auf die IgG-Titer

Ziel dieser Versuchsreihe war es, durch wiederholte Immunisierung der DO11.10-Mäuse mit Ovalbumin eine spezifische IgG-Immunantwort zu erhalten. Während der einzelnen Versuche erfolgte die Immunisierung der Versuchstiere mit vor dem Versuch festgelegten Dosen von Ovalbumin, gebunden an Aluminiumhydroxid-Adjuvans. Die Lösungen wurden intraperitoneal appliziert mit konstanten Volumina von 250 µl Lösung pro Tier. Dabei wurden in den Versuchen 1 bis 5 Ovalbuminmengen von 0 (n = 15 Tiere), 25 (n = 5 Tiere), 50 (n = 7 Tiere), 100 (n = 1 Tier), 250 (n = 10 Tiere), 500 (n = 1 Tier) und 1500 µg (n = 1 Tier) pro Maus verwendet.

In der Kontrollgruppe, in der die Tiere Natriumchloridlösung injiziert bekamen, lagen alle OD (optische Dichte)-Werte der IgG-Titer (relativer OD-Wert) unter 0,1 und damit eindeutig im negativen Bereich. Auch in der zweiten Kontrollgruppe, in der die Mäuse Aluminiumhydroxid-Adjuvans ohne Ovalbumin erhielten, lagen bei 91 % (10 von 11 Tieren) der Mäuse eindeutig negative IgG-Titer ($OD < 0,1$) vor.

Von den Tieren der Gruppen mit einer applizierten Ovalbuminmenge von 25 µg pro Maus zeigten 80 % negative oder nur schwach positive ($OD < 0,35$) IgG-Titer. Sowohl die Maus, die 1500 µg Ovalbumin erhalten sollte, als auch diejenige, die 50 µg erhalten sollte, verstarben während der ersten Blutentnahme. Beide Tiere wurden im ersten Versuch verwendet.

Aufgrund der zähflüssigen Konsistenz der Lösung von 1500 µg Ovalbumin wurde diese Lösung in den folgenden Versuchsreihen nicht weiter verwendet.

Die Gruppe, die mit 50 µg Ovalbumin immunisiert wurde, brachten 4 Tiere mit positivem Titer von insgesamt 7 Tieren hervor (57 % positiv). Ein vergleichbares Ergebnis zeigten die Versuchstiere, die 250 µg Ovalbumin appliziert bekamen. 6 Tiere (von 10 Tieren insgesamt) wiesen nach der Immunisierung einen positiven IgG-Titer auf (60 % positiv).

Nachdem alle IgG-Titer der Tiere, die 50 und mit 250 µg Ovalbumin zur Immunisierung appliziert bekamen, einander gegenübergestellt wurden, zeigte sich, dass in der 50 µg-Gruppe nur 1 von 4 positiven Tieren einen sehr hohen OD-Wert

über 3 zeigte. Hingegen gab es in der 250 µg-Gruppe 3 von 6 positiven Tieren mit einem OD-Wert über 3.

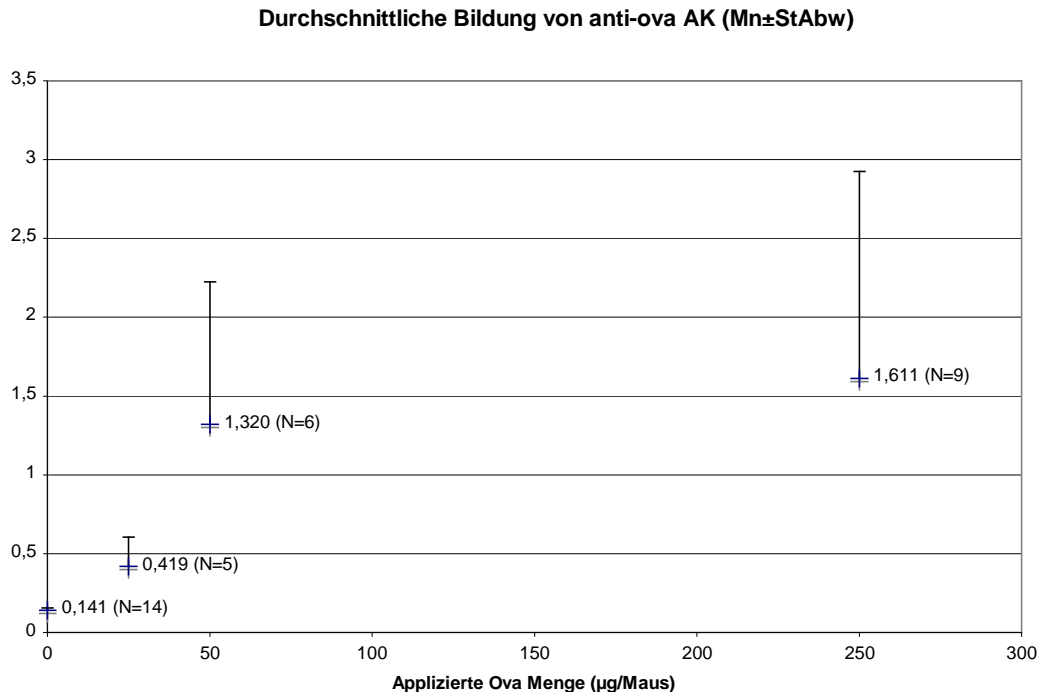


Abbildung 3.1.1:

Dieses Diagramm zeigt die Verteilung der Höhe der IgG-Werte bezogen auf die einzelnen Konzentrationen. Dabei sind alle IgG-Titer über 0,5 als positiv anzusehen. In die Auswertung fließen die Ergebnisse des ersten Versuches nicht ein.

Die ermittelten Werte der einzelnen Gruppen wurden miteinander verglichen, um zu überprüfen, ob die applizierte Ovalbuminmenge einen Einfluss auf die Höhe und die Häufigkeit positiver IgG-Titer hat.

Die Daten wurden statistischen Tests unterzogen, um die Hypothese zu untermauern. Zuerst wurde ein parametrischer Test, ein ANOVA-Test durchgeführt. Dieser ergab, dass die Ovalbuminmenge sehr wahrscheinlich ($p = 0,057$; 95 % Konfidenzintervall) einen Einfluss auf die IgG-Titer hat. Eine eindeutige Signifikanz war allerdings nicht nachweisbar.

Um die Wahrscheinlichkeit weiter zu untersuchen, erfolgte die Analyse der gesammelten Daten mit einem Mood-Median-Test. Das Ergebnis dieses Tests zeigte, dass die applizierte Menge von Ovalbumin einen signifikanten Einfluss ($p <$

0,001; 95 % Konfidenzintervall) auf die IgG-Titer hat. Die Gruppen mit den höchsten positiven IgG-Titer sind laut diesem Test die 50 und 250 µg-Gruppe.

Diese beiden Gruppen wurden nochmals untersucht, da in dem zusätzlich erstellten Boxplot zwischen ihnen trotz positiver IgG-Titer ein signifikanter Unterschied bestand. Der Median der IgG-Titer der 50 µg-Gruppe liegt bei 0,9 während er sich bei der 250 µg-Gruppe bei 1,03 befindet (Tabelle 3.1.1.) Hier kann man erkennen, dass Mäuse, die mit 250 µg Ovalbumin immunisiert wurden, höhere Maximalwerten der IgG-Titer erreichen als bei einer Immunisierung mit 50 µg.

Tabelle 3.1.1.

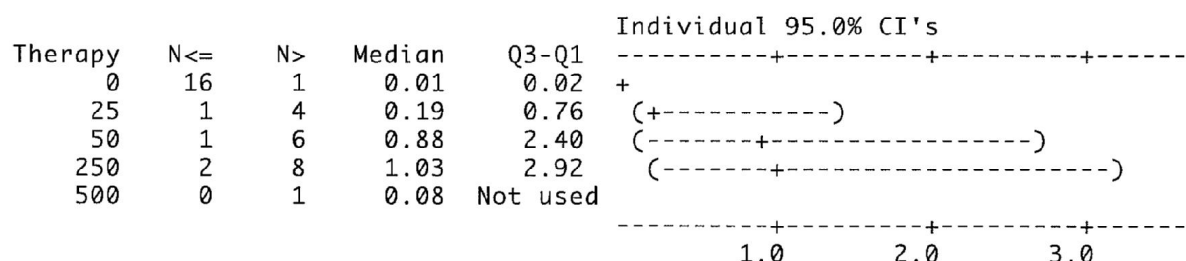
Datentabelle: Ovalbuminmenge, Mittelwert und Median der IgG-Titer (OD-Werte)

Wellenlänge bei Messung in nm	Anzahl der untersuchten Tiere	Ovalbuminmenge in µg	Median	Mittelwert	Niedrigster Messwert	Höchster Messwert
405	17	0	0,014	0,119	0,005	1,789
405	5	25	0,187	0,419	0,071	1,381
405	7	50	0,885	1,139	0,051	3,181
405	10	250	1,031	1,454	0,041	3,651
405	1	500	0,084	0,084	0,084	0,084

Außerdem zeigte ein Dotplot, dass die Variabilität der IgG-Titer in der zweihundertfünfzig Mikrogramm-Gruppe größer ist, als in der fünfzig Mikrogramm-Gruppe. Das bedeutet, dass bei ähnlichem Median in der 250 µg-Gruppe höhere Maximalwerte der IgG-Titer erreicht wurden, als in der 50 µg-Gruppe.

Mood median test of OD405nm

Chisquare = 22.20 df = 3 p = 0.000



Overall median = 0.08

* NOTE * Levels with < 6 obs. have confidence < 95.0%

MTB >

Abbildung 3.1.2.

Dotplot: Ovalbuminmenge im Vergleich mit den OD-Werten

Es wurde zusätzlich mit diesen beiden Gruppen ein T-Test durchgeführt, der ergab, dass der Unterschied zwischen diesen beiden Ovalbuminmengen keinen signifikanten Einfluss auf die verschiedene Verteilung der IgG-Titern in diesen beiden Gruppen hat ($p = 0,86$; 95 % Konfidenzintervall).

3.2. Einfluss des Geschlechts auf den IgG-Titer

Die Versuchstiere waren sowohl männlichen als auch weiblichen Geschlechts. Insgesamt gab es bei den Versuchsreihen 33 Männchen und 13 Weibchen der transgenen Mäuseart DO11.10. Für die Versuche 1 und 5 standen vorwiegend männliche Tiere zur Verfügung, da die vorhandenen Weibchen zur Nachzucht verwendet wurden und somit nur eingeschränkt für die Versuche eingesetzt werden konnten. Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere in Gruppen eingeteilt, wobei jede Gruppe der Versuche 2 bis 4 1 Weibchen und 2 Männchen enthielt. Eine Ausnahme bildeten die Kontrollgruppen, die Natriumchloridlösung erhielten. Hier wurden nur 1 Männchen, aber 2 weibliche Tiere eingeteilt.

Es wurde untersucht, ob das Geschlecht einen Einfluss auf den IgG-Titer hat. Die OD-Werte der Weibchen waren niedriger als die der Männchen mit vergleichbarer Ovalbuminmenge (siehe Abbildung 3.2.1).

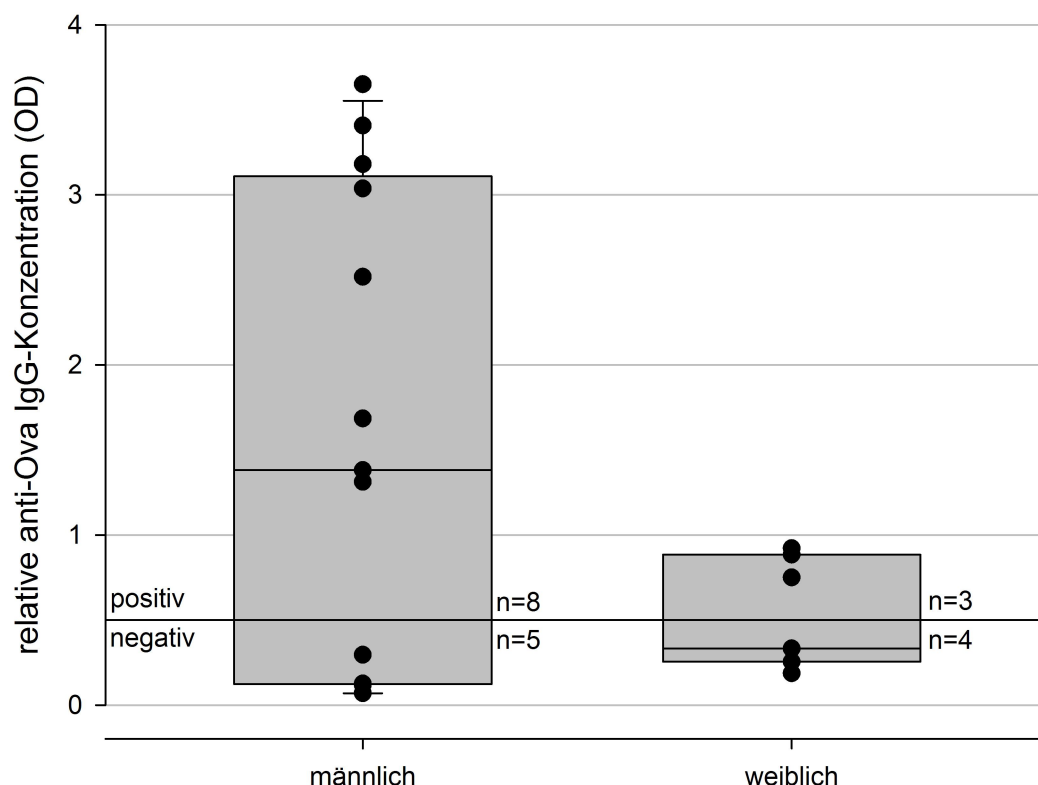


Abbildung 3.2.1: IgG-Titer (OD-Werte) aller Mäuse, die 25,50 und 250 µg Ovalbumin appliziert bekamen, unterteilt in Weibchen und Männchen. Insgesamt sind von 13 Männchen 8 eindeutig positiv (61,5 %) während von 7 Weibchen 3 eindeutig positiv

sind (42,9 %). Der Boxplot zeigt Median, 25/75 %-Grenzen und 5/95 %-Grenzen der Daten sowie die Einzelwerte.

Des Weiteren wurde ein Mood-Median-Test durchgeführt. Er untersucht einen möglichen Einfluss des Geschlechtes auf den IgG-Titer. In diesen Test fließen die Werte aller Tiere, die mit Ovalbumin immunisiert wurden, die Kontrollgruppen wurden nicht mit berücksichtigt. Der Test ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Geschlechtern ($p = 0,168$; 95 % Konfidenzintervall).

3.3. Einfluss des Alters auf den IgG-Titer

Ziel dieser Arbeit war es, eine reproduzierbare anti-Ovalbumin IgG-Immunantwort zu erreichen bei transgenen Mäusen (DO11.10). In allen Versuchsreihen hatten die verwendeten Tiere ein Alter zwischen 7 und 30 Wochen. Nach Abschluss der Studie wurde das Alter der Tiere zu Beginn des Versuches mit dem ermittelten IgG-Titer in einer Tabelle verglichen (Abbildung 3.3.1), um einen Einfluss des Alters des Versuchstieres auf die Höhe des IgG-Titers zu untersuchen. Dafür erfolgte eine Einteilung der Tiere entsprechend des Alters in drei verschiedene Gruppen. Die Daten zeigten, dass Tiere im Alter von über 150 Tagen nach Immunisierung mit Ovalbumin in 45 % der Fälle negative IgG-Titer produzierten. Fünfzig Prozent der Tiere im Alter von unter 90 Tagen produzierten negative IgG-Titer. Man kann erkennen, dass Mäuse im Alter zwischen 90 Tagen (circa 13 Wochen) und 150 Tagen (circa 21 Wochen) in 25% negative IgG-Titer produzieren.

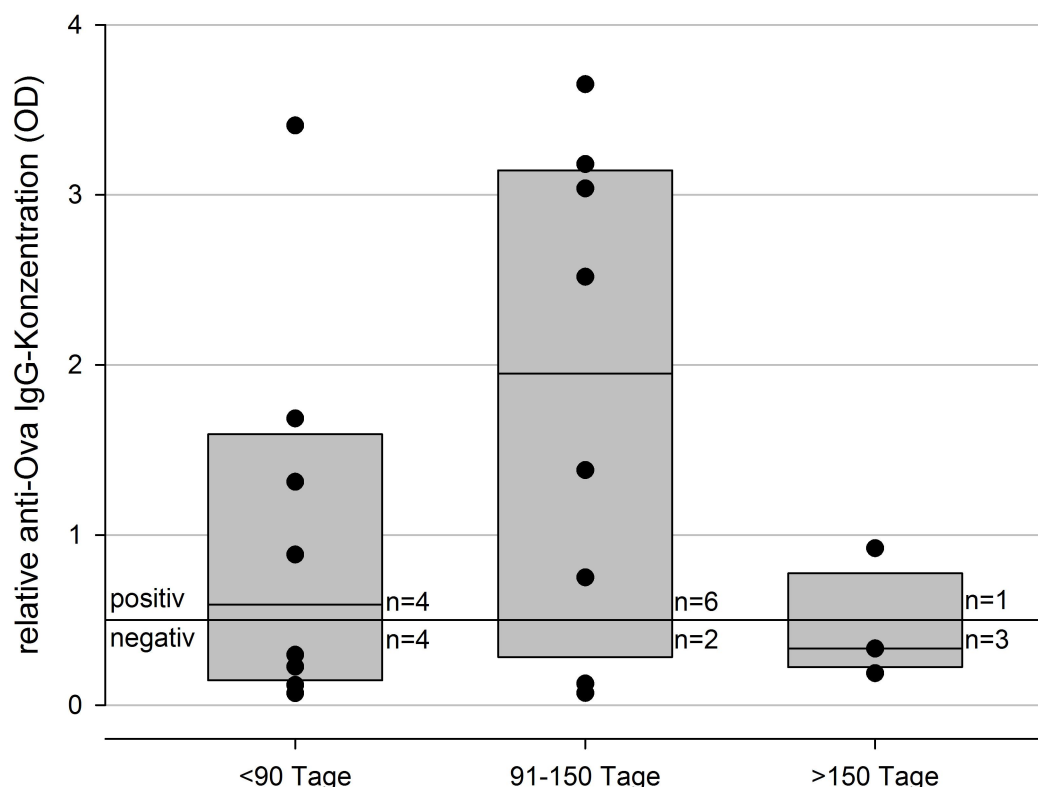


Abbildung 3.3.1.: Einfluss des Alters der DO11.10-Mäuse auf den anti-OVA IgG Serumspegel. Das Alter der Versuchstiere zu Versuchsbeginn, die Ovalbuminmengen von 25 bis 250 µg erhalten haben, wird mit den gemessenen IgG-

Titern verglichen. Das Alter ist in Tagen angegeben und die IgG-Werte (OD-Werte) sind in einer Verdünnung von 1:1000 dargestellt. Werte über 0,5 sind positiv.

In Gruppe 1 haben 4 von 8 Tieren eindeutig positive IgG-Titer (50 % positiv). Davon hat ein Tier einen OD-Wert größer als 3. In der Gruppe 2 finden sich 6 Tiere von 8 mit eindeutig positiven IgG-Titern (75 % positiv), von denen 3 Tiere einen OD-Wert über 3 haben. Und in der Gruppe 3 gibt es ein eindeutig positives Tier von 4 (25 % positiv). Die Tiere zwischen 87 und 113 Tagen produzierten die höchsten IgG-Titer.

Es wurde außerdem ein Mood-Median-Test mit den Originalwerten der einzelnen Mäuse aus der 50 und 250 µg-Gruppe durchgeführt. Dieser Test ergibt, dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Alter eines Tieres und dem IgG-Titer besteht ($p = 0,023$; 95 % Konfidenzintervall).

3.4. Einfluss der Versuche auf den IgG-Titer

Insgesamt wurden für diese Arbeit fünf Versuchsreihen zu verschiedenen Zeitpunkten mit jeweils unterschiedlichen Anzahlen von Versuchstieren durchgeführt (siehe Tabelle 1 Anhang). Um einen Fehler innerhalb der einzelnen Versuchsreihen zu minimieren, erfolgte ein Vergleich der Versuchsergebnisse untereinander abhängig von der Versuchsnummer. Zu Beginn der Versuche wurde die Menge an Ovalbumin festgelegt, welche jedem Tier intraperitoneal verabreicht wurde. In den Versuchen verteilte sich diese auf 0 (n = 16 Tiere), 25 (n = 5 Tiere), 50 (n = 7 Tiere), 250 µg (n = 11 Tiere), 500 µg (n = 1 Tier) und 1500 µg pro Maus (siehe Tabelle 2 Anhang).

Der erste Versuch bestand aus einer Gruppe von 6 männlichen Mäusen. Von diesen verstarben 2 Tiere während der ersten Blutentnahme, vor der Immunisierung. Die vorgesehenen intraperitoneal applizierten Ovalbuminmengen reichten von 0 bis 1500 µg, um die optimale Dosis für die folgenden Versuche zu finden. Nach dem Tod der beiden Versuchstiere wurde aufgrund der geringeren Tierzahl und der Probleme hinsichtlich der Zähflüssigkeit der Ovalbuminlösung die Dosis reduziert. Lösungen, die über 500 µg in 250 µl Volumen enthielten, blieben teilweise an den Wänden der Behälter kleben und verstopften die Kanülen. So wurde die höchste Einzeldosis von 1500 auf 500 µg reduziert. In diesem ersten Versuch gab es keine Mäuse mit einem positiven IgG-Titer.

Die Versuchsreihen 2 und 3 umfassten jeweils 13 Tiere beider Geschlechter. Jeweils 4 der 13 Tiere wurden als Kontrolle verwendet (erhielten kein Antigen). Im Laufe des Versuches Nummer 2 verstarb ein Tier unter der Narkose für die erste Blutentnahme. In diesem Versuch hatten 5 der 8 immunisierten Tiere einen IgG-Titer über 0,3 (= 62,5 % positiv).

Zu Beginn des dritten Versuches starb ein Tier ebenfalls unter der Narkose für die erste Blutentnahme. 4 weitere Tiere verstarben während dieses Versuches in dem Zeitraum zwischen Immunisierung und Boosterung. Bei den überlebenden Tieren waren 3 der 4 immunisierten Tiere (75 %) positiv hinsichtlich ihres IgG-Titers.

Zur weiteren Eingrenzung der optimalen Dosis wurde der vierte Versuch mit 10 Versuchsmäusen beider Geschlechter durchgeführt. Während des Versuches erhielten die Tiere 0 (Kontrollgruppe), 50 oder 250 µg Ovalbumin intraperitoneal.

Kein Tier verstarb. Von den 6 immunisierten Mäusen hatten 3 einen positiven IgG-Titer (50 %). Es fand sich auch bei einem Tier der Kontrollgruppe, welches nur Aluminiumhydroxid-Adjuvans appliziert bekommen hatte, ein positiver OD-Wert..

Der letzte Versuch bestand aus einer Gruppe von 6 männlichen Tieren, von denen eines heterozygot und ein anderes homozygot das Transgen für ein Interleukin-2-knockout trugen. Diese beiden Tiere fließen aufgrund ihres zweiten Transgens nicht in die Wertung mit ein. Die Mäuse bekamen in diesem Versuch entweder 0 oder 250 µg Ovalbumin intraperitoneal verabreicht. Auch bei diesem Versuch gab es keine Todesfälle. Von den 2 immunisierten Tieren, die in die Auswertung einfließen, hat eines einen positiven IgG-Titer (50 %).

Nach Auswertung der erhobenen Daten ist nachgewiesen, dass kein Einfluss auf die Höhe der IgG-Titer durch die Eingruppierung der Mäuse in einen bestimmten Versuch zu erkennen ist. Es wurde ein Mood-Median-Test durchgeführt, in dem die Versuchsnummern den IgG-Titern gegenübergestellt waren. Es gibt keinen signifikanten Einfluss ($p = 0,232,95$ % Konfidenzintervall) der Versuchszugehörigkeit eines Tieres auf dessen IgG-Titer.

3.5. Einfluss der DO11+/CD4+ Expression auf den IgG-Titer

Im Laufe der Versuchsreihen wurde damit begonnen, die Co-Expression sowohl des DO11-, als auch des CD4-Rezeptors auf derselben Zelle mittels FACS-Analyse zu überprüfen. Die Frage stellte sich, ob eine sehr hohe oder eine sehr niedrige Anzahl DO11- und CD4-exprimierender Zellen die Höhe der ovalbuminspezifischen IgG-Titer beeinflusst. Insgesamt wurden 19 Mäuse getestet. Von diesen fließen 4 allerdings nicht in die Versuchsauswertung ein, da sie im Versuchsverlauf verstarben. Weiterhin fließen auch die Werte der Tiere aus den beiden Kontrollgruppen nicht ein, da hier keine Immunisierung stattgefunden hat. Es konnte kein Zusammenhang zwischen IgG-Titer und Expression des DO11- und des CD4-Rezeptors nachgewiesen werden. Eine Übersicht über die verwendeten Daten gibt Abbildung 3.5.1.

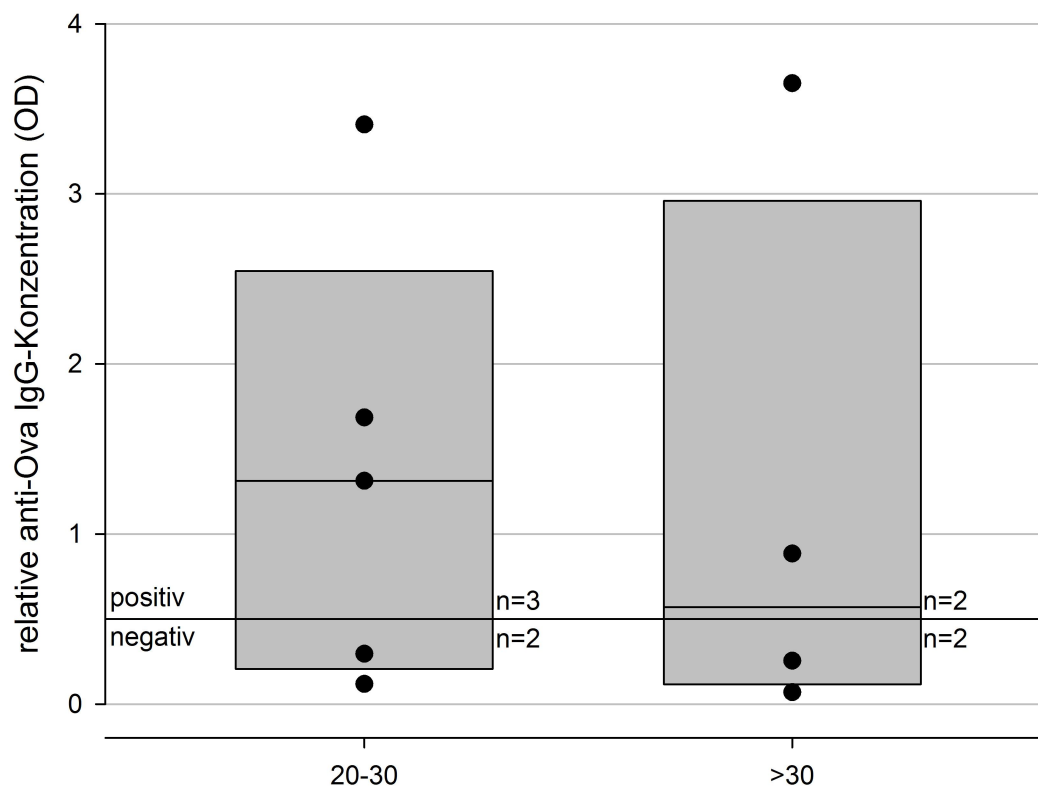


Abbildung 3.5.1:

IgG-Werte (OD-Werte) und die DO11+/CD4+-Zellen in Prozent der Gesamtzellen. Die erste Gruppe enthält alle Tiere, die 20 bis 30 % DO11+/CD4+-Zellen haben. Hier haben 3 von 5 Tieren positive IgG-Titer (60 %). In die zweite Gruppe wurden alle Mäuse eingeordnet, bei denen über 30 Prozent der Zellen das Merkmal

DO11+/CD4+ tragen. In dieser Gruppe finden sich 2 positive von 4 untersuchten Tieren.

Es konnte gezeigt werden, dass die Ausprägung der Expression der DO11+/CD4+-Zellen keinen signifikanten Einfluss auf die IgG-Titer hat ($p = 0,320$; 95 % Konfidenzintervall).

3.6. Standardisierter ELISA

Insgesamt wurden für diese Arbeit fünf Versuchsreihen zu verschiedenen Zeitpunkten mit jeweils unterschiedlichen Anzahlen von Versuchstieren durchgeführt. In den Versuchen 2 bis 4 wurde bei jedem ELISA eine Standardkurve mitgeführt, um Fehler durch äußere Einflüsse oder andere beeinflussende Faktoren erkennen und neutralisieren zu können, und somit die endgültigen Werte besser vergleichen zu können. Eine ausführliche Beschreibung des standardisierten ELISA ist in Kapitel 2.2 dargestellt. In den folgenden Kapiteln werden die standardisierten Werte (KO-OD-Werte) näher betrachtet und die Aussagen, die auf der Grundlage dieser Werte getroffen werden, mit denen der nicht standardisierten Werte verglichen. Nach Vergleich der ebenfalls mitgeführten Testkurven mit den Optische Dichte-Werten sind KO-OD-Werte ab 0,01 mg/ml als eindeutig positiv zu werten und ab 0,9 mg/ml OD-Werten über 3 gleichzusetzen.

3.7. Einfluss der applizierten Ovalbuminmenge auf die IgG-Titer (KO-OD-Werte)

Während der Versuchsreihen wurden die Versuchstiere mit vor dem Versuch festgelegten Dosen von Ovalbumin, gebunden an Aluminiumhydroxid-Adjuvans, immunisiert. Die dabei verwendeten Ovalbuminmengen und die Applikationsart sind in Kapitel 3.2 aufgeführt.

In den beiden Kontrollgruppen (Natriumchlorid und Aluminiumhydroxid-Adjuvans) lagen 92,3 % der KO-OD-Werte der IgG-Titer unter 0,005 mg/ml und damit eindeutig im negativen Bereich. Lediglich ein Tier hatte einen eindeutig positiven IgG-Titer (KO-OD = 0,055 mg/ml). Dies entspricht den Ergebnissen der Auswertung der OD-Werte.

Die Tiere, die in den Gruppen mit einer applizierten Ovalbuminmenge von 25 µg pro Maus eingeteilt waren, entwickelten in 32,3 % eindeutig positive (KO-OD > 0,01 mg/ml) IgG-Titer.

In der Gruppe, in der die Tiere mit 50 µg Ovalbumin immunisiert wurden, konnte bei 5 von insgesamt 6 Versuchstieren ein positiver IgG-Titer nachgewiesen werden (83,3 % positiv). In der 250 µg-Gruppe wurde bei 6 von 9 getesteten Tieren ein positiver IgG-Titer nachgewiesen. Damit hatten in dieser Gruppe 66,7 % der Mäuse einen eindeutig positiv IgG-Titer.

Die Gruppen wurden hinsichtlich der Höhe der KO-OD-Werte (IgG-Titer) verglichen. Besonderes Interesse galt den Werten größer als 0,09 mg/ml, welche OD-Werten über 3 entsprechen. Die Gegenüberstellung der beiden letzten Gruppen zeigte, dass in der 50 µg-Gruppe nur 1 von 5 positiven Tieren einen KO-OD-Wert über 0,09 mg/ml hatte. Hingegen gab es in der 250 µg-Gruppe 2 von 6 positiven Tieren mit einem solchen hohen KO-OD-Wert.

Nach der Betrachtung dieser Werte wurde die Hypothese aufgestellt, dass auch bei der Auswertung der KO-OD-Werte die applizierte Ovalbuminmenge einen erheblichen Einfluss auf die Höhe und die Häufigkeit positiver IgG-Titer hat. Um außerdem zu klären, ob Unterschiede zwischen der Auswertung der OD-Werte und der der KO-OD-Werte bestehen, wurden alle KO-OD-Werte den OD-Werten gegenübergestellt (Abbildung 3.7.1.).

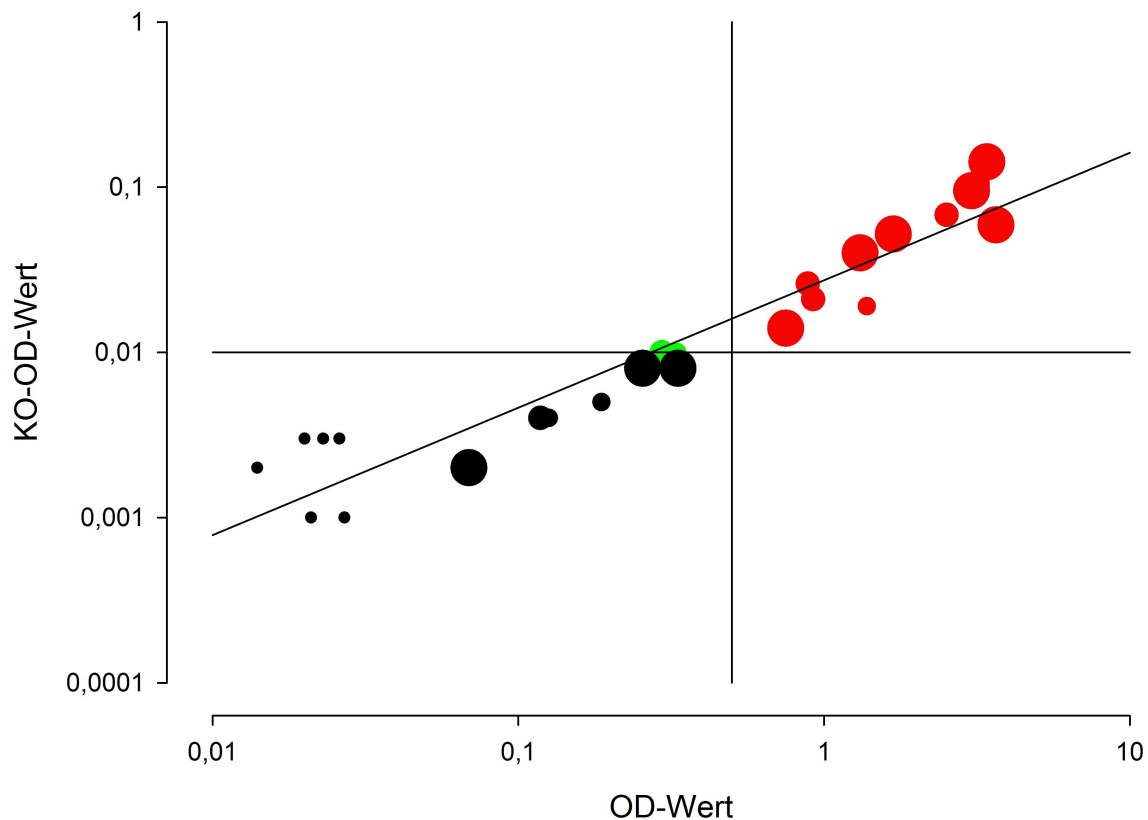


Abbildung 3.7.1.: Vergleich der Werte für die OD- und KO-OD-Werte. Die Kontrolllinien geben den Cut-off-Wert an. Die Durchmesser der Punkte entsprechen den 4 Konzentrationen 0, 25, 50 und 250 µg/Maus. Negative Tiere sind schwarz, positive rot angegeben. Zwei Tiere werden bei Verwendung der KO-OD-Daten positiv (grün).

In den Gruppen, in denen die Tiere 25 µg erhielten, ist bei den OD-Werten eins von 5 Tieren (20 %) positiv. Bei den KO-OD-Werten sind 2 von 5 Tieren (40 %) positiv.

Betrachtet man die KO-OD-Werte, so bringt eine applizierte Konzentration von fünfzig Mikrogramm die meisten positiven IgG-Titer bei den Versuchstieren hervor. (OD-Werte: 4 von 7 Tieren positiv = 57,1 %, KO-OD-Werte: 5 von 6 Tieren positiv = 83,3 %)

Wenn man hingegen die OD-Werte analysiert, dann produzieren die Tiere die meisten positiven IgG-Titer, die 250 µg Ovalbumin erhalten haben (OD-Werte: 6 von 10 Tieren positiv = 60 %, KO-OD-Werte: 6 von 9 Tieren positiv = 66,7 %).

Wenn man die Höhe der IgG-Titer betrachtet, so sieht man bei beiden Wertarten das gleiche Ergebnis. Die Tiere, die 250 µg Ovalbumin appliziert bekamen, haben am häufigsten Titer über 3 (OD) beziehungsweise 0,9 mg/ml (KO-OD).

3.8. Einfluss des Geschlechts auf die KO-OD-Werte

Die Aufteilung der Tiere wurde in Kapitel 3.3 bereits ausführlich beschrieben.

Nach Abschluss der Versuchsreihen ergab die Betrachtung der OD-Werte, dass das Geschlecht einen Einfluss auf den IgG-Titer hat. Die OD-Werte der Weibchen waren niedriger als die der Männchen mit vergleichbarer Ovalbuminmenge. In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Auswertung der OD-Werte denen der KO-OD-Werte gegenübergestellt (siehe Tabelle 3.8.1.).

Tabelle 3.8.1:

IgG-Titer in OD-Werten und KO-OD-Werten aller Versuchsgruppen, die Ovalbumin appliziert bekamen, unterteilt in Weibchen und Männchen

	OD-Wert		KO-OD-Wert in mg/ml	
	Negativ	Positiv	Negativ	Positiv
Männchen	0,069 0,071 0,118 0,126 0,295	1,313 1,381 1,685 2,518 3,038 3,181 3,408 3,651	0,002 0,004 0,004 0,002	0,104 0,068 0,095 0,019 0,059 0,010 0,052 0,142 0,040
Weibchen	0,187 0,255 0,331 0,333	0,750 0,885 0,922	0,005 0,008 0,008	0,021 0,010 0,014 0,026

In dieser Tabelle aufgelistet sind die IgG-Titer in OD-Werten und KO-OD-Werten aller Versuchsgruppen, die 25, 50 und 250 µg Ovalbumin appliziert bekamen, unterteilt in Weibchen und Männchen. Die eindeutig positiven Werte blau markiert. Insgesamt wurden die Werte von 13 männlichen und 7 weiblichen Tiere in der Auswertung analysiert.

Bei den OD-Werten sind von 13 Männchen 8 eindeutig positiv (= 61,5 %) während von 7 Weibchen 3 eindeutig positiv sind (= 42,9 %).

Betrachtet man die KO-OD-Werte, so findet man bei den 13 Männchen 9 positive (69,2 %). Unter den 7 ausgewerteten Weibchen sind 4 positive (57,1 %). Die männlichen Tiere haben in den Versuchsreihen häufiger positive IgG-Titer produziert als die weiblichen Tiere.

Wenn man die Höhe der positiven Werte vergleicht, zeigt sich, dass alle Titer größer als 3 (OD) beziehungsweise 0,9 mg/ml (KO-OD) von Männchen produziert wurden. Die Daten wurden graphisch in Abbildung 3.8.1. dargestellt.

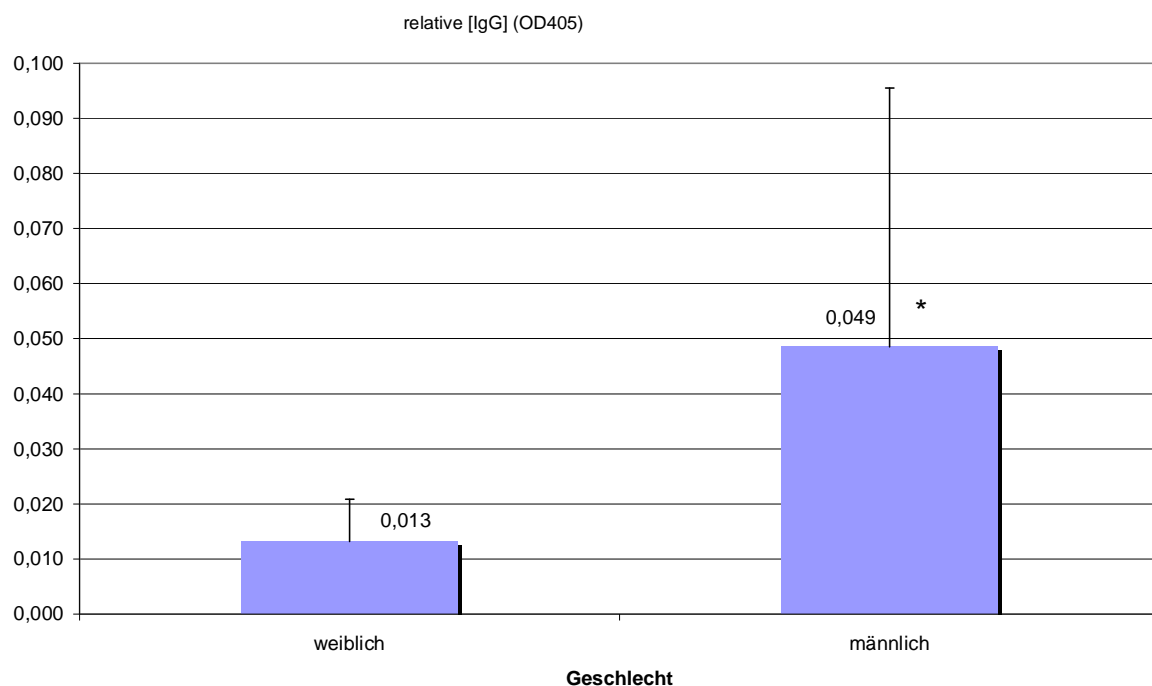


Abbildung 3.8.1.:

In dieser Abbildung sind auf der X-Achse die Geschlechter aufgetragen. Auf der Y-Achse findet sich die KO-OD-Wert-Einteilung in mg/ml.

3.9. Einfluss des Alters auf die KO-OD-Werte

Nach Ermittlung des IgG-Titers in KO-OD-Werten wurde das Alter zu Beginn des Versuches mit dem dazugehörigen OD-Wert in einer Tabelle aufgeführt und mit den KO-OD-Werten verglichen (Tabelle 3.9.1.). Dafür erfolgte eine Unterteilung der Tiere entsprechend des Alters in 3 Gruppen. Die Daten zeigten, dass Tiere im Alter von über 150 Tagen geringere IgG-Titer produzierten als jüngere Tiere. Tiere im Alter von unter 87 Tagen produzierten ebenfalls geringe IgG-Titer. Mäuse im Alter zwischen 87 Tagen (circa 12,5 Wochen) und 150 Tagen (circa 21 Wochen) produzierten am häufigsten positive und höhere IgG-Titer.

Tabelle 3.9.1.:

Alter der Versuchstiere, die Ovalbumin erhalten haben, am Beginn des Versuches mit den gemessenen IgG-Titern

Alter (in Tagen)	<87	87 bis 150	>150
OD-Werte negativ	0,096 0,118 0,255 0,295	0,071 0,126	0,187 0,331 0,333
OD-Werte positiv	0,885 1,313	0,750 1,381 1,685 2,518 3,038 3,181 3,651 3,408	0,922
KO-DO-Werte in mg/ml negativ	0,004 0,002 0,008	0,002 0,004	0,005 0,008
KO-DO-Werte in mg/ml positiv	0,010 0,026 0,040	0,014 0,019 0,052 0,059 0,068 0,095 0,104 0,142	0,010 0,021

In dieser Tabelle wird das Alter der Versuchstiere, die Ovalbuminmengen von 25 bis 250 µg erhalten haben, am Beginn des Versuches mit den gemessenen IgG-Titern verglichen. Das Alter ist in Tagen angegeben und die IgG-Werte (OD-Werte und KO-OD-Werte) sind in einer Verdünnung von 1:1000 dargestellt. Die eindeutig positiven Werte sind blau markiert.

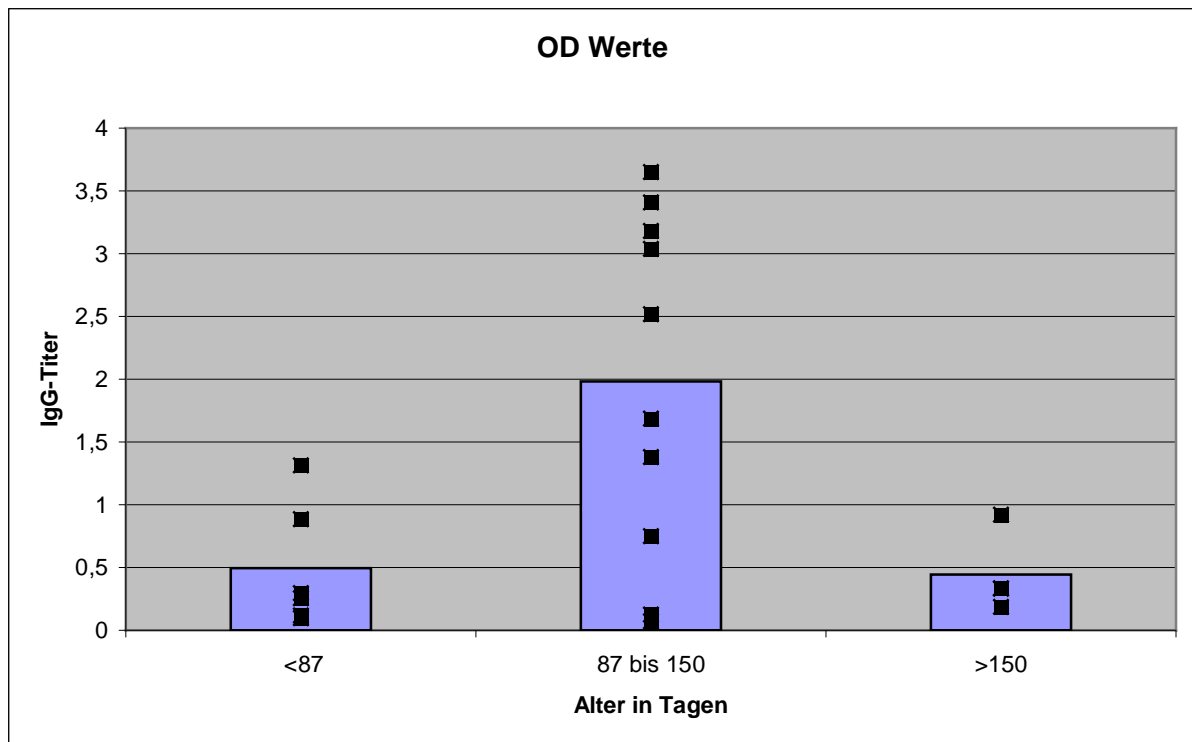


Abbildung 3.9.1

In dieser Graphik wird das Alter der in Tabelle 3.9.1. aufgeführten Tiere am Beginn des Versuches mit den gemessenen IgG-Titern in Form von OD-Werten verglichen.

In Gruppe 1 (Tiere jünger als 87 Tage) haben 2 von 6 Tieren eindeutig positive anti-Ovalbumin-IgG-Titer (Optische Dichte-Wert, OD-Wert) (33,3 % positiv). Davon hat kein Tier einen OD-Wert größer als 3.

In der zweiten Gruppe (Tiere im Alter von 87 bis 150 Tagen) finden sich 8 Tiere von 10 mit eindeutig positiven IgG-Titern (80 % positiv), von denen vier Mäuse einen OD-Wert über 3 haben.

Und in der Gruppe 3 (Tiere älter als 150 Tage) gibt es ein eindeutig positives Tier von 4 (25 % positiv). Hier gibt es keinen Titer größer als 3.

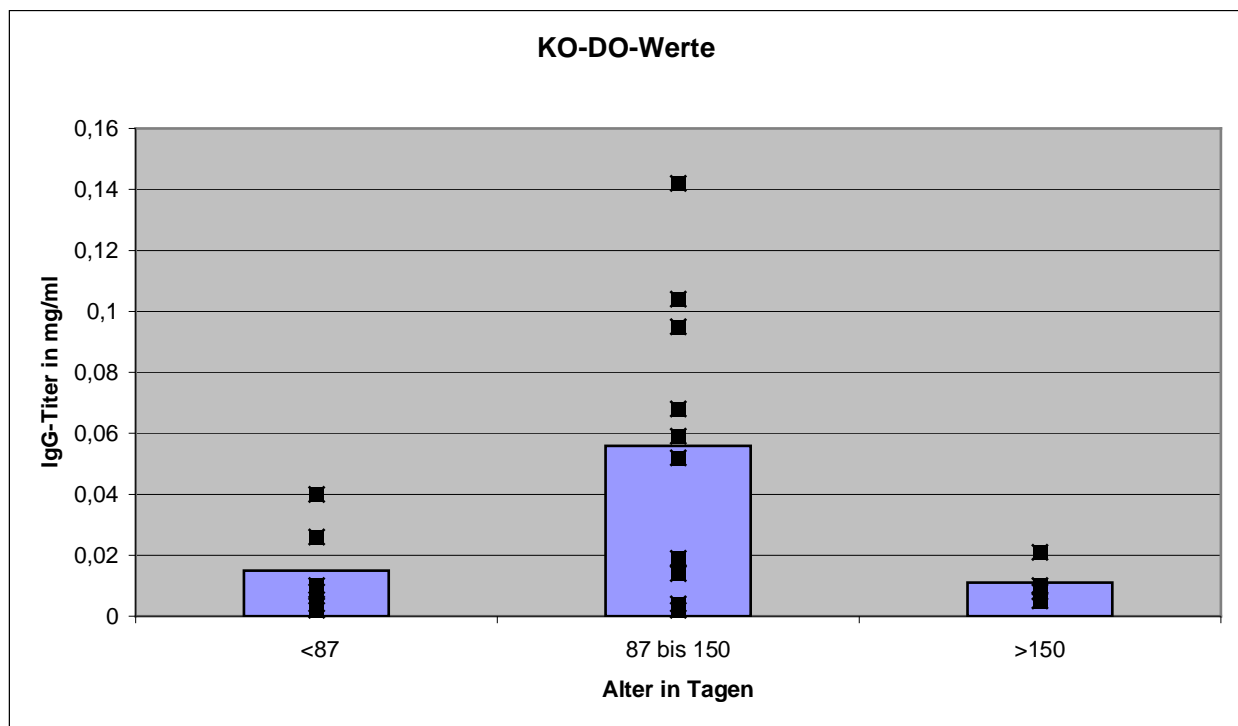


Abbildung 3.9.2.:

Hier sind alle Versuchstiere dargestellt, die in Tabelle 3.9.1 aufgelistet sind. Dieses Diagramm stellt die IgG-Titer in Form von KO-OD-Werten (mg/ml; Y-Achse) dem Alter der Versuchstiere in Tagen (X-Achse) gegenüber, unabhängig von den applizierten Ovalbuminkonzentrationen.

Betrachtet man die KO-OD-Werte, so findet man in Gruppe 1 (Tiere jünger als 87 Tage) 3 positive von insgesamt 6 Versuchstieren (50 % positiv). Keines dieser positiven Tiere hat einen Titer über 0,9 mg/ml.

In der zweiten Gruppe (Tiere im Alter von 87 bis 150 Tagen) sind 8 von 10 Tieren positiv (80 % Prozent). 3 der 8 positiven Mäuse produzierten KO-OD-Werte größer als 0,9 mg/ml.

Die dritte Gruppe (Tiere älter als 150 Tage) brachte 2 positive von insgesamt 4 Tieren (50 %) hervor, von denen keines einen IgG-Titer über 0,9 mg/ml hatte.

Bei KO- und KO-OD-Werten produzieren die Mäuse im Alter zwischen 87 und 150 Tagen am häufigsten positive IgG-Titer. Außerdem findet man in diesem Alter Werte über 3 (OD) beziehungsweise 0,9 mg/ml (KO-OD).

3.10. Einfluss der Versuche auf den IgG-Titer in KO-OD-Werten

Es wurden 4 Versuchsreihen mit insgesamt 34 Tieren ausgewertet. Tabelle 3 in den Anlagen zeigt alle Tiere mit den dazugehörigen OD- und KO-OD-Werten und den entsprechenden Versuchsnummern.

Nachfolgend werden die einzelnen Versuche bezüglich der Häufigkeit und der Höhe positiver IgG-Titer miteinander verglichen. Dabei werden die OD- und die KO-OD-Werte einzeln betrachtet und miteinander verglichen. Im Versuch 1 gab es bei beiden IgG-Werten keine positiven Titer. Der Versuch war angesetzt als Vorversuch zur Eingrenzung der zu applizierenden Ovalbuminmengen und geht deshalb in die Auswertung nicht mit ein. Der Versuch 2 zeigte 5 (62,5 %) positive Tiere bei den OD-Werten und 4 (50 %) positive Tiere bei den KO-OD-Werten. Insgesamt wurden 8 Tiere in diesem Versuch mit Ovalbumin immunisiert und 4 Tiere gehörten zur Kontrollgruppe. Im Versuch 3 gab es 4 (100 %) positive Tiere in beiden IgG-Werten von 4 immunisierten Tieren. 4 weitere Tiere wurden als Kontrollgruppe eingestuft. Zum Versuch 4 gehörten 10 Versuchsmäuse, von denen 6 Tiere immunisiert und 4 als Kontrollgruppe eingeteilt wurden. Bei den immunisierten Tieren gab es drei (50 %) positive OD-Werte und 4 (66,67 %) positive KO-OD-Werte. Auch bei einem Kontrollgruppentier konnte ein positiver IgG-Titer bei den OD- und KO-OD-Werten nachgewiesen werden. An Versuch 5 nahmen 6 Tiere teil, von denen 2 jedoch nicht in die Auswertung einfließen, da sie einen anderen Genotyp aufweisen. Von den 4 verbliebenen Tieren hatten 2 (50 %) positive IgG-Titer, sowohl bei den OD- als auch bei den KO-OD-Werten.

Nach Auswertung der oben angeführten Daten zeigte sich, dass kein Einfluss auf die Höhe der IgG-Titer durch die Eingruppierung der Mäuse in einen bestimmten Versuch zu erkennen ist. Um dies zu bestätigen, wurde ein Mood-Median-Test durchgeführt, in dem die Versuchsnummern den IgG-Titern gegenübergestellt waren. Das Ergebnis wurde durch diesen Test bestätigt. Es gibt keinen signifikanten Einfluss der Versuchszugehörigkeit eines Tieres auf dessen IgG-Titer.

3.11. Einfluss der DO11+/CD4+ Expression auf die KO-OD-Werte

Der Einfluss der Häufigkeit der DO11.10/CD4-Co-Expression auf die Ausprägung der OD-Werte wurde schon in Kapitel 3.5. ausführlich beschrieben. In diesem Kapitel soll nun die Höhe der KO-OD-Werte mit der Rate der DO11.10+/CD4+-Zellen verglichen werden. Außerdem werden die Ergebnisse der Gegenüberstellung aus Kapitel 3.5 mit den Ergebnissen der jetzigen Gegenüberstellung verglichen. Auch bei der Auswertung der KO-OD-Werte wurden die Tiere der beiden Kontrollgruppen nicht berücksichtigt. Insgesamt wurden hier 9 Tiere betrachtet. Die Versuchstiere stimmen mit denen aus Kapitel 3.5 überein.

Eine Übersicht über die verwendeten Daten gibt Tabelle 3.11.1.

Tabelle 3.11.1.:

DO11+/CD4+-Zellen in Prozent der gemessenen Gesamtzellen und die entsprechenden IgG-Werte als OD- und als KO-OD-Werte.

DO11+/CD4+-Zellen in % der gemessenen Zellen	<20	20-30	>30
OD-Werte negativ		0,118 0,295	0,069 0,255
OD-Werte positiv		1,313 1,685 3,408	0,885 3,651
KO-DO-Werte in mg/ml negativ		0,004	0,002 0,008
KO-DO-Werte in mg/ml positiv		0,01 0,040 0,052 0,142	0,026 0,059

Dargestellt sind in dieser Tabelle die DO11+/CD4+-Zellen in Prozent der gemessenen Gesamtzellen und die bei den Versuchstieren ermittelten IgG-Werte als OD- und als KO-OD-Werte. Die bei den Versuchstieren ermittelten Werte der DO11+/CD4+-Zellen wurden zur einfacheren Übersicht in drei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe enthält alle Tiere mit Werten unter 20 % DO11+/CD4+-Zellen. Der zweiten Gruppe gehören alle Mäuse an, die 20 bis 30 % DO11+/CD4+-Zellen haben. In die letzte Gruppe wurden alle Mäuse eingeordnet, bei denen über 30 % der Zellen

sowohl den DO11- als auch den CD4-Rezeptor tragen. Die positiven IgG-Titer sind blau markiert, die negativen IgG-Titer schwarz.

Alle Tiere wiesen mehr als 20 % CD4+/DO11+-Zellen auf. In der Gruppe 2 finden sich unter den 5 getesteten Tieren in der Gruppe der OD-Werte 3 (60 %) positive und in der Gruppe der KO-OD-Werte 4 (80 %) positive Tiere. In der Gruppe 3 hatten von 4 Tieren 2 in beiden IgG-Titer-Gruppen positive Werte.

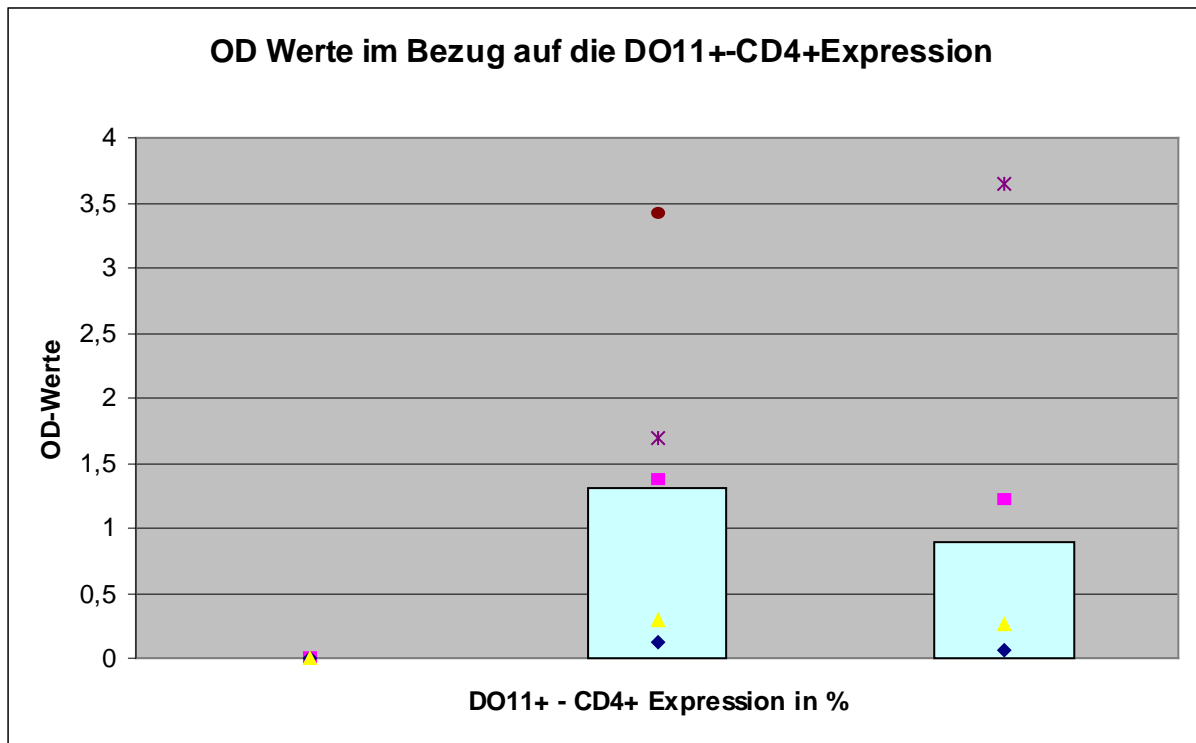


Abbildung 3.11.1.:

In der Abbildung 3.11.1 ist die Höhe des IgG-Titers (OD-Werte, Daten aus Tabelle 3.11.1.) in Beziehung zur Menge der CD4+/DO11+-Zellen in Prozent der gemessenen Zellen dargestellt.

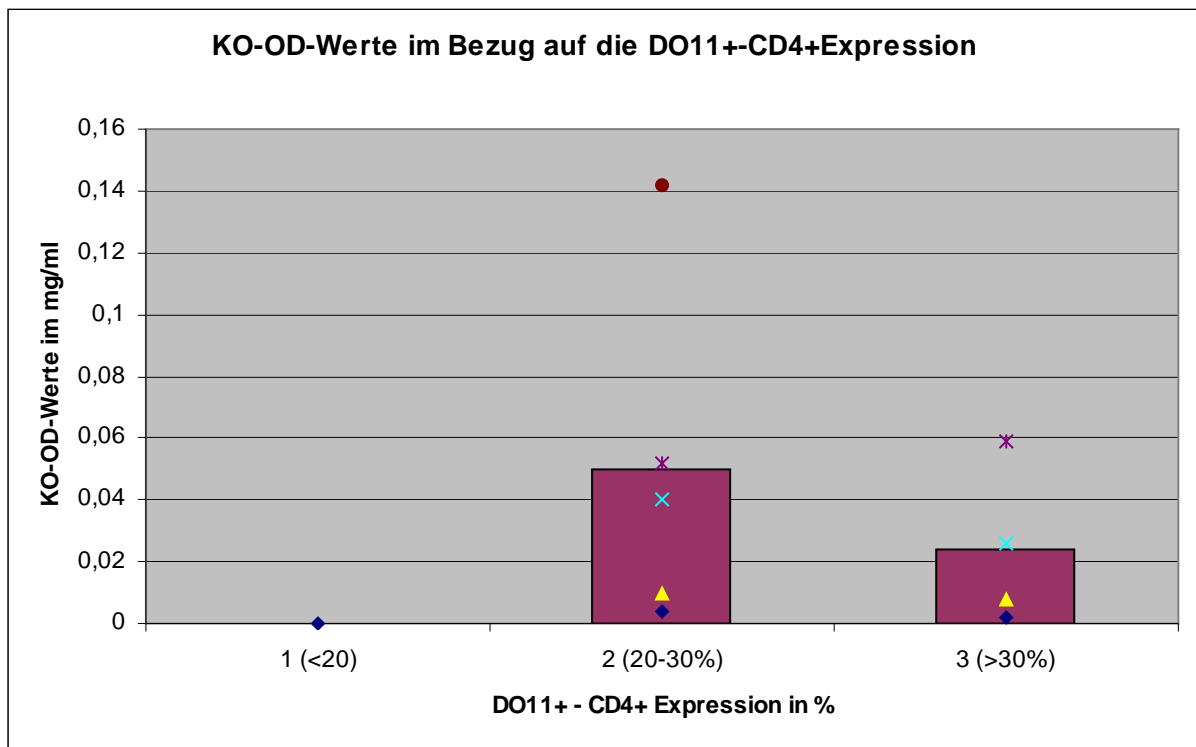


Abbildung 3.11.2.

In dieser Darstellung sind die KO-OD-Werte aus Tabelle 3.11.1 aufgeführt. Auf der X-Achse findet sich die Menge der CD4+/DO11+-Zellen in Prozent der gemessenen Zellen. Die Y-Achse enthält die IgG-Titer als KO-OD-Werte in mg/ml.

Es gibt keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Menge der CD4+/DO11+-Zellen und der Höhe des IgG-Titers.

Um einen Vergleich zwischen den Ergebnissen der Auswertung der OD-Werte und der KO-OD-Werte zu haben, sind in Tabelle 3.11.2 die Tiere mit den IgG-Titern als OD- und KO-OD-Werte aufgeführt, bei denen die CD4/DO11-Expression getestet wurde und die nicht zur Kontrollgruppe gehören.

Tabelle 3.11.2.:

Hier ist die Nummer des jeweiligen Versuchstieres mit der zugehörigen Menge CD4+/DO11+-Zellen in Prozent der gemessenen Zellen aufgeführt

Mausnummer	DO11.10+/CD4+- Zellen in %	IgG-Titer –OD-Werte	IgG-Titer-KO-OD- Werte in mg/ml
165	47,55	0,885	0,026
172	29,58	0,295	0,01
173	26,79	0,118	0,004
141	32,8	3,651	0,059
170	34,9	0,255	0,008
200	22,43	1,685	0,052
201	20,77	3,408	0,142
302	37	0,069	0,002
303	27,06	1,313	0,040

Diese Tabelle zeigt in Spalte eins die Nummer des jeweiligen Versuchstieres mit der zugehörigen Menge CD4+/DO11+-Zellen in Prozent der gemessenen Zellen. In Spalte drei finden sich die bei dem Tier am 6. Tag nach Boosterung ermittelten IgG-Titer als OD-Werte und in Spalte 4 als KO-OD-Werte in mg/ml. Die positiven IgG-Titer sind blau gekennzeichnet.

3.12. Die OT-I und -II-Mäuse

Ein bisher wenig erforschtes Tiermodell sind transgene Mäuse, die einen ovalbuminspezifischen T-Zell-Rezeptor auf CD3+CD8+-T-Suppressor-Zellen (OT I) oder CD3+CD4+-T-Helfer-Zellen (OT II) exprimieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde im Tierstall des Max-Bürger-Forschungszentrums in Leipzig eine Zucht dieser Tiere geführt.

Die Zucht der OT II-Mäuse wurde mit dem Ziel geführt, drei Transgene in einer Maus zu vereinen: einen transgenen T-Zell-Rezeptor, ein humanes CD4 und ein knockout des murinen CD4. Im Laufe der Zucht zeigte sich jedoch, dass bei einem großen Teil der Zuchttiere spontane irreponible Darmvorfälle auftraten. (Bilder 1 und 2). Vor allem die weiblichen Mäuse waren davon betroffen. Diese Erkrankung ist äußerst schmerzhaft und führt zu Apathie, Verweigerung der Nahrung und schließlich über einen Darmverschluss zum Tod der Tiere.

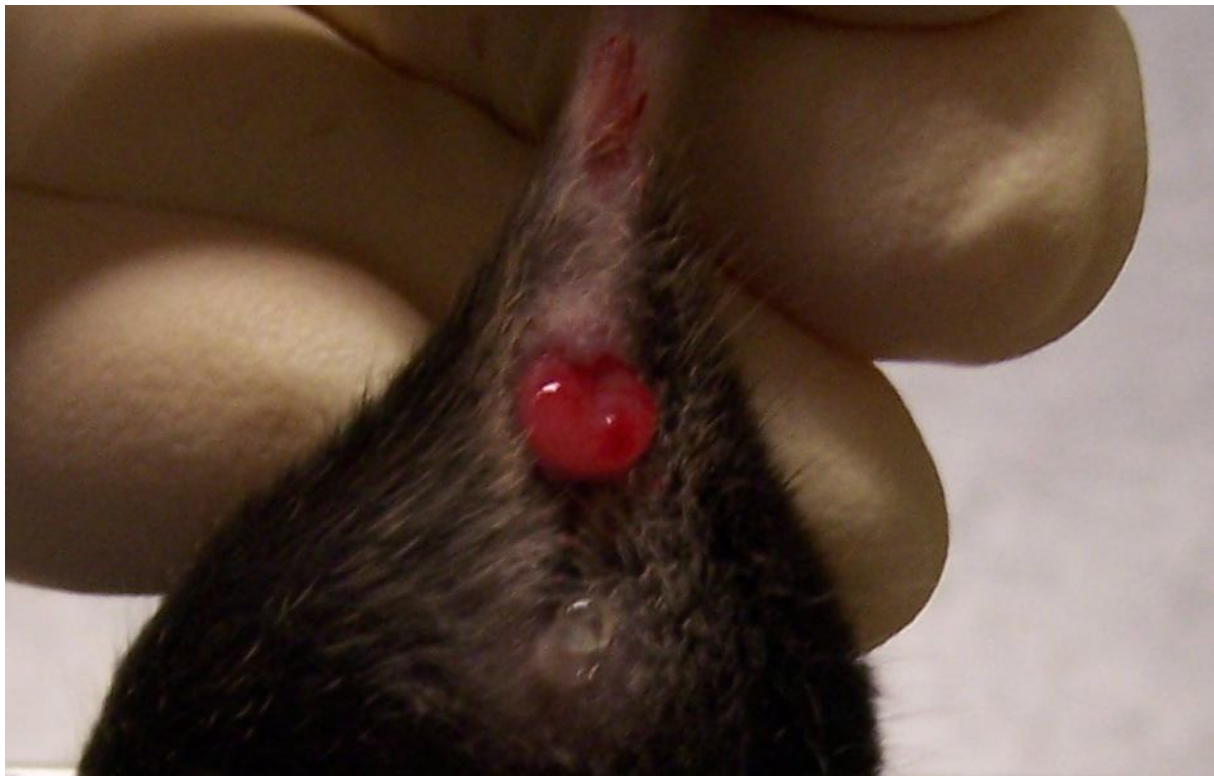


Abbildung 3.12.1.

OT-II-Maus mit prolabierte Darm

Auf diesem Bild ist eine OT-II-Maus aus der Zucht des Medizinisch-Experimentellen Zentrums der Medizinischen Fakultät Leipzig zu sehen. Man erkennt den prolabierte Darm, welcher bis zu einem Darmverschluss führen kann.

Um den erkrankten Tieren unnötiges Leid zu ersparen, mussten sie getötet werden. Bei den Weibchen wurde diese Erkrankung vor allem nach der Geburt des ersten Wurfes beobachtet. Somit schrumpfte der Bestand der zuchtfähigen Tiere erheblich. Sowohl bei den OT-I- als auch bei den OT-II-Mäusen wurde schon bei den ersten Würfen eine zweite schwere Erkrankung festgestellt. Die Mäuse waren an Lymphomen erkrankt. Schon unter den ersten zwanzig Tieren wurden drei Fälle gefunden. Als Symptome traten, retrograd betrachtet, Apathie, Schwellung des Abdomens und struppiges Fell auf. Die pathologische Untersuchung der erkrankten Tiere zeigte bis zu zehnfache Vergrößerungen der Milz (5,5 mal 0,75 cm) und der Leber, eine massive Schwellung der Lymphknoten (bis zu einem Durchmesser von 0,4 cm) und eine etwa fünffache Vergrößerung des Thymus im Vergleich zu normalen C57BL6-Mäusen (Bilder 3.12.2. und 3.12.3.). Die Blutuntersuchungen ergaben eine normale Anzahl von T-Zellen, Monozyten und Granulozyten. Allerdings konnte bei mehreren Tieren eine erhöhte Anzahl von B-Zellen nachgewiesen werden, so dass zunächst von einem B-Zell-Lymphom ausgegangen wurde.

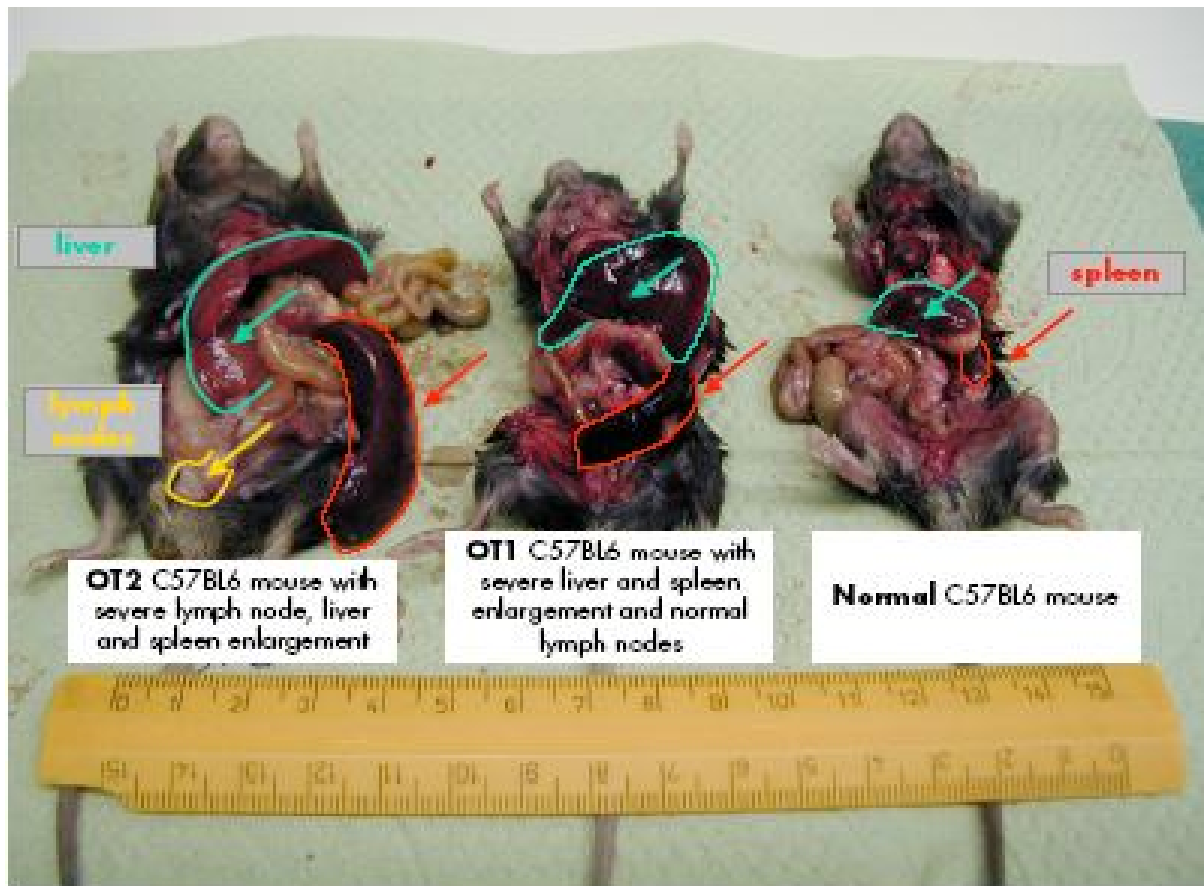


Abbildung 3.12.2.

Vergleich der Organgröße von nicht transgenen C57BL6-Mäusen, OT-I- und OT-II-Mäusen

In diesem Bild ist im Vergleich die Organgröße von nicht transgenen C57BL6-Mäusen, OT-I- und OT-II-Mäusen dargestellt. Man erkennt deutlich den Größenunterschied der Organe der transgenen Tiere zu denen der nicht transgenen Maus. Außerdem ist auf diesem Bild zu sehen, dass die OT-II-Maus an einer sehr viel ausgeprägteren Form des Lymphoms leidet, als die OT-I-Maus



Bild 3.12.3.

Das Bild zeigt das Ausmaß der Organvergrößerung bei der OT-II-Maus. Vor allem die enorme Größe der Lymphknoten ist hier gut zu erkennen.

Um die Erkrankung frühzeitig zu erkennen, wurden bei den OT-I- und OT-II-Tiere regelmäßige Laborkontrollen durchgeführt.

Da die Krankheit jedoch nicht heilbar ist und auch durch Selektion nicht vermieden werden kann, sind diese transgenen Mäuse für eine Zucht ungeeignet. Deshalb wurde die Zucht eingestellt, die Tiere getötet und das Serum, der Thymus und die Milz auf signifikante Veränderungen der Anteile der einzelnen Zellfraktionen untersucht. Die Ergebnisse sind in diesem Kapitel aufgeführt.

3.13. Untersuchung der Immunzellen der OT-II-Zucht

Bei den OT-II-Tieren erkrankten regelmäßig vor allem Weibchen nach ihren ersten Würfen an Darmvorfällen. Außerdem fielen bei einigen Mäusen ein deutlich geschwollenes Abdomen sowie allgemeine Krankheitssymptome wie struppiges Fell und Appetitlosigkeit auf. Um die Ursache für diese Symptome zu erforschen, wurde die Zucht eingestellt und alle Tiere, nachdem sie getötet wurden, untersucht. Bereits bei der makroskopischen Inspektion der Organe fiel bei einigen Tieren eine enorme

Vergrößerung aller Immunologischen Organe (Milz, Leber, Lymphknoten) auf. Das Blut, die Milz und der Thymus wurden bei allen Tieren separat untersucht.

3.13.1. Blut

Nach dem Töten der Tiere wurden diese ausgeblutet. Die Verarbeitung des Blutes entspricht der Methodik des ersten Versuches (siehe Materialien und Methoden). Zu dem gewonnen Blut wurden nun die oben genannten Antikörper zugegeben, so dass der Anteil bestimmter Zellpopulationen an der insgesamt gemessenen Zellzahl bestimmt werden konnte. Die Bestimmung dieser Werte wurde mit Hilfe des FACS-Gerätes durchgeführt. In der folgenden Tabelle (3.13.1.) sind die Zellpopulationen CD4+/CD8- und CD8+/CD4- dargestellt.

Tabelle 3.13.1.

T-Zellwerte im Blut der untersuchten Mäuse

Probennummer	CD4+/CD8- (T-Helferzellen)	CD8+/CD4- (cytotox. T-Zellen)		
Blut 014	7,42	1,99		
Blut 018	2,37	0,94		
Blut 092	4,75	1,33		
Blut 095	7,26	2,59		
Blut 098	2,48	2,70		
Blut 104	8,16	2,35		
Blut 119	4,61	2,17		
Blut 122	3,63	4,23		
Blut 125	0,40	0,73		

In dieser Tabelle sind die gemessenen T-Zellwerte im Blut der untersuchten Mäuse im Verhältnis zu der Gesamtzahl der gemessenen Zellen dargestellt. In der ersten Spalte sind die Probennummern dargestellt. Die Spalten 2 und 3 zeigen eine Auflistung der gemessenen Werte von T-Helfer- und zytotoxischen T-Zellen. Deutlich erhöhte Werte in Spalte 3 sind rot markiert. Die Werte dieser Tabelle wurden in Abbildung 3.13.1. graphisch dargestellt.

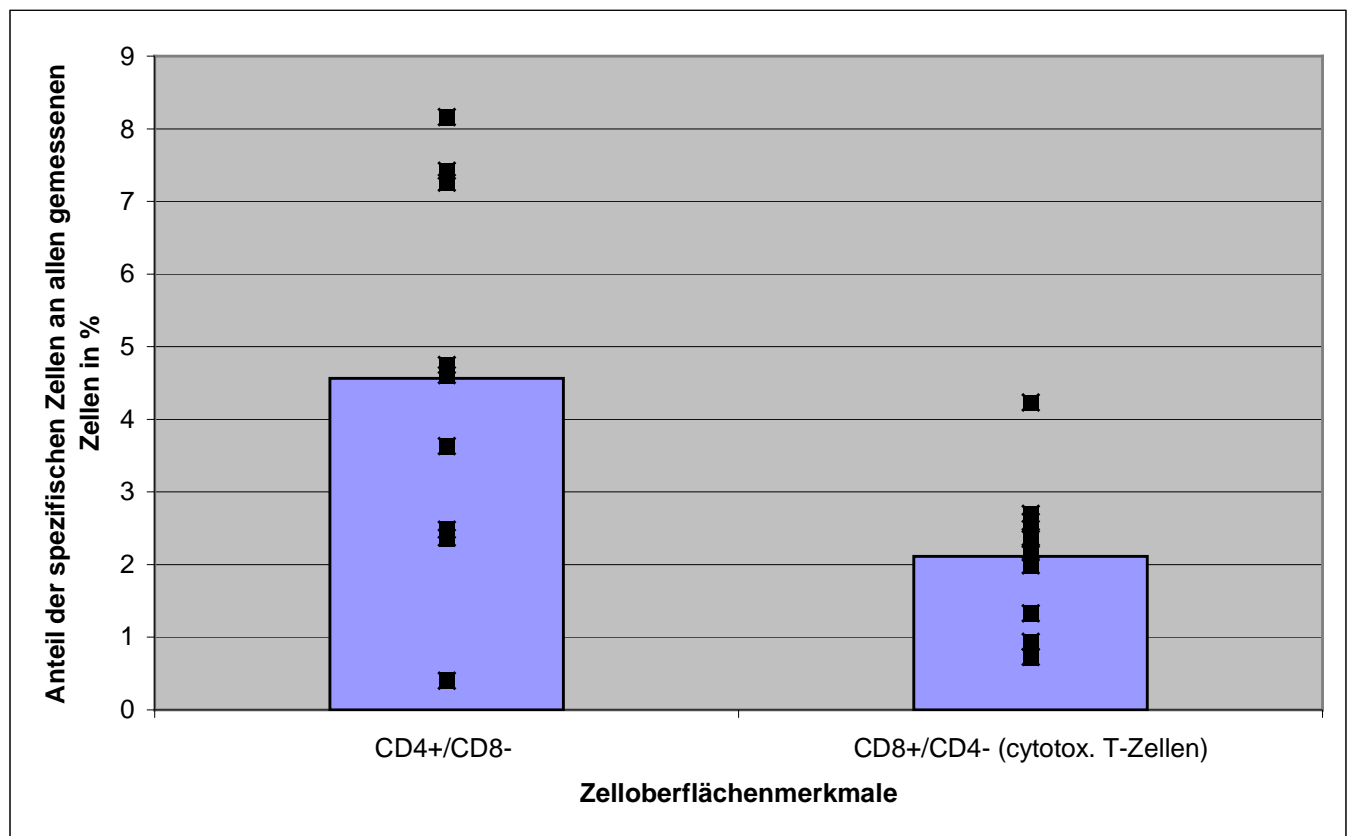


Abbildung 3.13.1:

In dieser Abbildung sind die gemessenen Werte von T-Helfer- und zytotoxischen T-Zellen im Blut der untersuchten Mäuse im Verhältnis zu der Gesamtzahl der gemessenen Zellen dargestellt.

3.13.2. Thymus

Das zweite untersuchte Organ ist der Thymus. Er ist für die Differenzierung und Reifung der T-Zellen verantwortlich. Die Organe wurden post mortem entfernt und die Immunzellen isoliert. Das weitere Vorgehen entspricht dem unter Kapitel 3.13.1. Die Antikörperkombinationen wurden beibehalten. Tabelle 3.13.2. zeigt eine Gegenüberstellung der Zellpopulationen CD4+/CD8- und CD8+/CD4-.

Tabelle 3.13.2.

T-Zellwerte im Thymus

Probennummer	CD4+/CD8- (T-Helferzellen)	CD8+/CD4- (cytotox. T-Zellen)		
Thymus 271	14,00	4,14		
Thymus 312	0,00	0,50		
Thymus 324	0,12	0,00		
Thymus 378	5,00	0,00		
<i>Median</i>	<i>11,90-12,00</i>	<i>2,44-2,7</i>		

In dieser Tabelle sind die gemessenen T-Zellwerte im Thymus der untersuchten Mäuse im Verhältnis zu der Gesamtzahl der gemessenen Zellen dargestellt. In der ersten Spalte sind die Probennummern dargestellt. Die Spalten 2 und 3 zeigen eine Auflistung der gemessenen Werte von T-Helfer- und zytotoxischen T-Zellen. Der Medianwert findet sich in der letzten Zeile.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.13.2. graphisch dargestellt.

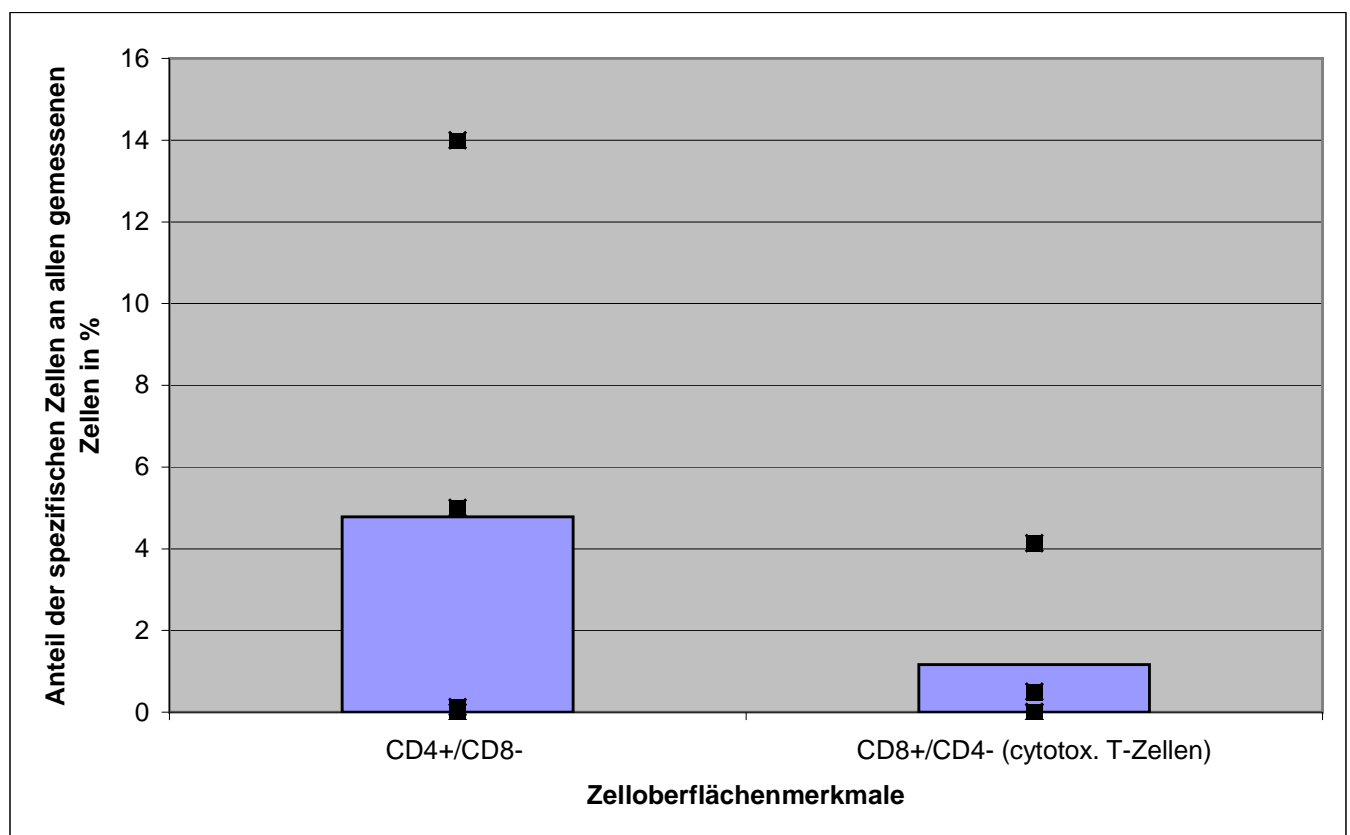


Abbildung 3.13.2.

In dieser Abbildung sind die gemessenen Werte von T-Helfer- und zytotoxischen T-Zellen im Thymus der untersuchten Mäuse im Verhältnis zu der Gesamtzahl der gemessenen Zellen dargestellt.

3.13.3. Milz

Das letzte untersuchte Organ der Versuchstiere ist die Milz. Sie ist das größte lymphatische Organ. Neben dem Abbau alter oder beschädigter Erythrozyten speichert die Milz sowohl T- (periarteriolar) als auch B-Lymphozyten (umgeben die T-Lymphozyten = Primärfollikel). Für diese Untersuchung wurden wie beim Thymus die Immunzellen separiert und mit den schon bekannten Antikörperkombinationen untersucht. In Tabelle 3.13.3.1 findet sich eine Gegenüberstellung der Zellpopulationen CD4+/CD8- und CD8+/CD4- sowie der Tiere mit drei und vier Transgenen.

Tabelle 3.13.3.1.

T-Zellwerte in der Milz

Probennummer	CD4+/CD8- (T-Helferzellen)	CD8+/CD4- (cytotox. T-Zellen)	3 Transgene	4 Transgene
Milz 132	17,42	10,5	+	-
Milz 136	10,83	9,24	+	+
Milz 140	15,55	10,76	+	-
Milz 144	13,86	5,64	+	-
Milz 148	8,27	3,34	-	-
Milz 152	4,76	10,59	+	-
Milz 156	1,99	7,93	+	-
Milz 160	5,47	11,9	+	-
Milz 164	14,11	13,15	+	-
Milz 168	16,56	11,48	+	-
Milz 172	17,90	6,74	+	-
Milz 176	21,35	8,78	+	-
Milz 180	5,85	8,44	+	-
Milz 184	5,24	6,35	+	-
Milz 188	18,90	7,58	+	-
Milz 191	18,57	7,41	+	-

Milz 194	7,14	6,32	+	-
Milz 197	12,90	4,89	+	+
Milz 200	12,37	7,64	+	+
Milz 203	10,66	6,29	+	-
Milz 206	15,58	5,67	+	+
Milz 209	13,52	4,18	-	+
Milz 212	8,77	4,91	+	+
Milz 215	9,82	7,74	+	+
Milz 218	11,92	6,37	+	+
Milz 221	12,34	5,41	+	+
Milz 224	17,93	5,04	+	+
Milz 227	19,94	5,33	+	+
Milz 230	17,27	4,26	+	+
Milz 233	18,88	4,47	-	+
Milz 236	17,86	3,58	-	+
Milz 239	7,47	2,39	-	+
Milz 242	12,72	6,24	-	+
Milz 245	16,31	3,88	-	+
Milz 248	8,78	3,85	-	+
Milz 251	8,94	6,53	+	+
Milz 254	9,39	6,46	+	+
Milz 257	15,54	4,98	+	+
Median	12,72-12,9	6,32-6,35		

In dieser Tabelle sind die gemessenen T-Zellwerte in der Milz der untersuchten Mäuse im Verhältnis zu der Gesamtzahl der gemessenen Zellen dargestellt. In der ersten Spalte sind die Probennummern dargestellt. Die Spalten 2 und 3 zeigen eine Auflistung der gemessenen Werte von T-Helfer- und zytotoxischen T-Zellen. Deutlich erhöhte Werte in Spalte 2 sind rot, in Spalte 3 blau markiert. In den Spalten 4 und 5 ist der Genotyp der untersuchten Tiere dargestellt. In der letzten Zeile ist der, der jeweiligen Spalte zugehörige Medianwert dargestellt.

Die Tabelle 3.13.3.1. zeigt, dass von 38 untersuchten Tieren 5 deutlich erhöhte T-Helferzellwerte haben (13,2 %). 5 weitere Tiere zeigen eine über die Hälfte des Normalwertes erhöhte Zahl an zytotoxischen T-Zellen.

Eine deutliche Erhöhung der T-Helferzellanzahl über die Hälfte des Normalwertes (Medianwert) tritt in 60 % der Fälle bei Tieren mit 3 Transgenen und in 40 % bei Tieren mit 4 Transgenen auf. Eine Erhöhung der Anzahl der zytotoxischen T-Zellen zeigt sich nur bei Tieren mit 3 Transgenen.

B-Zellen

Im Rahmen der oben genannten Versuche wurden die betreffenden Organe auf Zellen mit dem Merkmal humanes HLA untersucht. Da im Rahmen der FACS-Untersuchungen nur Lymphozyten betrachtet wurden, sind Zellen, welche dieses Merkmal tragen und CD4/TCR negativ sind, mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit B-Zellen. So ist es möglich, zwischen einem B- und einem T-Zell-Lymphom zu unterscheiden. In den folgenden Tabellen sind die Untersuchungsergebnisse der einzelnen Organe aufgeführt.

Tabelle 3.13.3.2.

Werte der Blutuntersuchung

Probe	TCR-/CD4-	TCR-/hu- HLA+/huCD4-	CD4-/hu- HLA+/huCD4-
Blut 004	91,78	89,56	90,05
Blut 008	59,93	70,79	74,17
Blut 012	94,82	94,45	95,14
Blut 016	95,42	94,61	94,48
Blut 020	98,53	97,14	97,46
Blut 024	97,89	81,30	82,86
Blut 028	96,15	52,14	54,88
Blut 032	89,47	52,71	59,08
Blut 041	87,66	55,37	49,33
Blut 045	69,38	49,63	51,57
Blut 049	69,07	66,41	67,19
Blut 053	88,45	44,66	49,97
Blut 057	85,18	44,23	55,87
Median	89,47	66,41	67,19

Hier sind die Werte der Blutuntersuchungen dargestellt. In der ersten Spalte sind die Probennummern aufgezählt. In den Spalten 2 bis 4 sind die gemessenen Werte im Blut der Versuchstiere mit den in der ersten Zeile aufgeführten Merkmalen aufgeführt. In der letzten Zeile sind die zu den Spalten gehörigen Medianwerte dargestellt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.13.3.2 graphisch dargestellt.

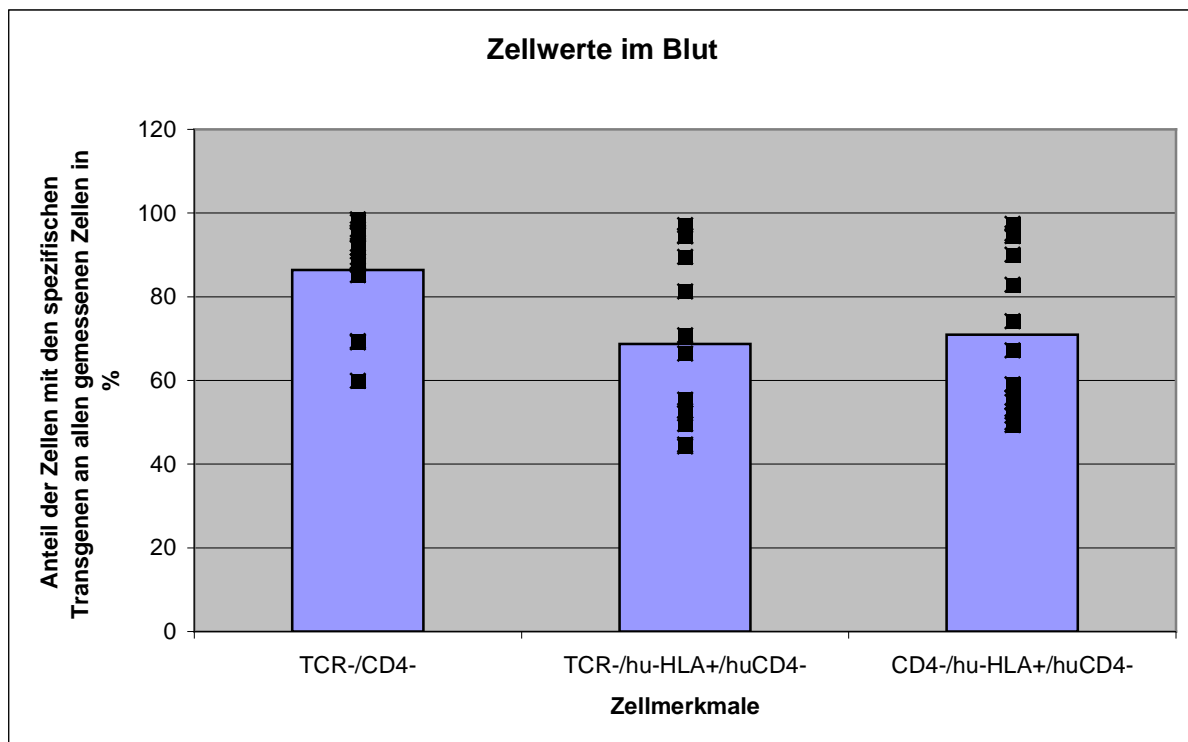


Abbildung 3.13.3.2:

Hier sind die Werte der Blutuntersuchungen dargestellt. Auf der X-Achse finden sich die untersuchten Zellmerkmale. Die Y-Achse zeigt den Anteil der untersuchten Zellen an allen gemessenen Zellen in %.

Tabelle 3.13.3.3.:

Werte der Thymusuntersuchung

Probe	TCR-/CD4-	TCR-/hu-HLA+/huCD4-	CD4-/hu-HLA+/huCD4-
Thymus 261	8,55	8,23	6,6
Thymus 265	47,58	28,64	32,12
Thymus 269	3,96	10,45	4,23
Thymus 273	41,72	41,78	13,56
Thymus 277	9,24	8,71	13,21
Thymus 281	20,00	15,00	15
Thymus 285	62,70	8,72	12,97
Thymus 289	12,86	11,43	11,43
Thymus 293	6,30	77,26	7,07
Thymus 297	53,21	69,69	46,85
Thymus 301	3,07	8,54	2,93
Thymus 305	32,66	32,73	30,71
<i>Thymus 309</i>	<i>10,94</i>	<i>63,08</i>	<i>17,31</i>
Thymus 261	8,55	8,23	6,6
Median	12,86	15,00	13,21

Hier sind die Werte der Thymusuntersuchungen aufgeführt. In der ersten Spalte sind die Probennummern aufgezählt. In den Spalten 2 bis 4 sind die gemessenen Werte im Blut der Versuchstiere mit den in der ersten Zeile aufgeführten Proben aufgeführt. In der letzten Zeile finden sich die zu den Spalten gehörigen Medianwerte.

In Abbildung 3.13.3.3. sind die Werte graphisch dargestellt.

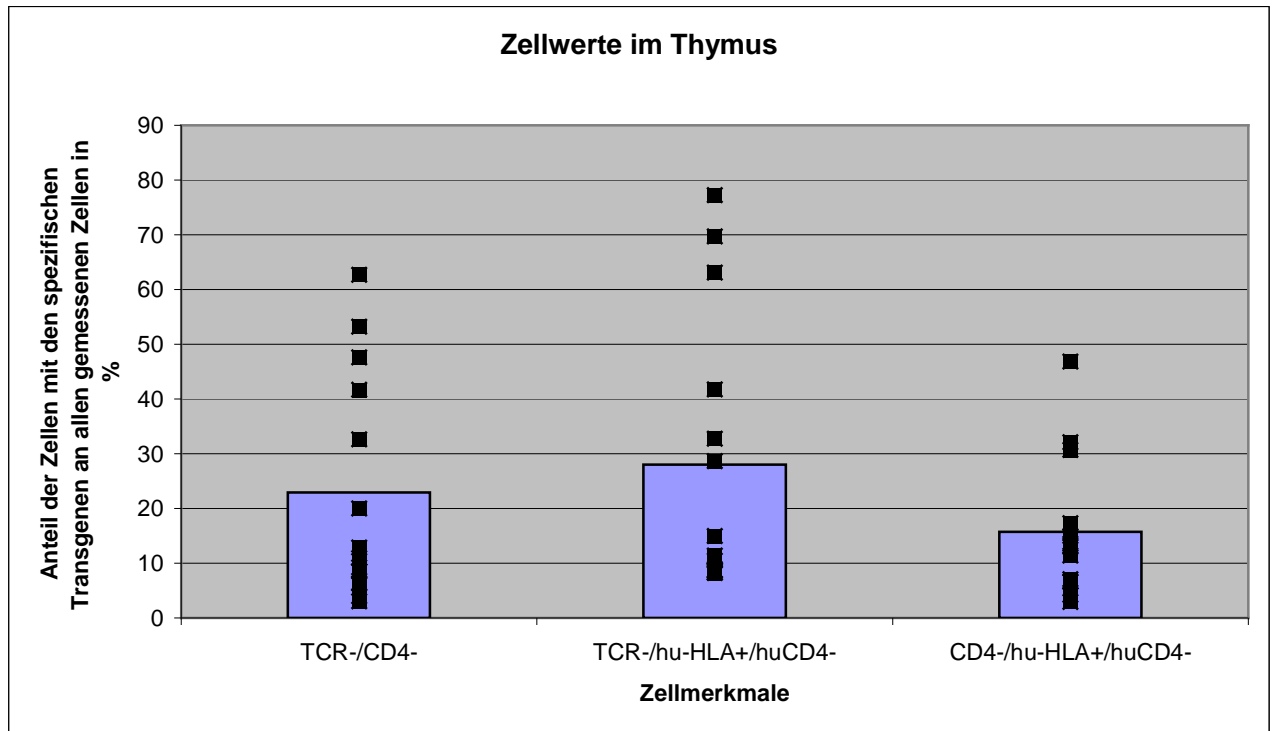


Abbildung 3.13.3.3.

Hier sind die Werte der Thymusuntersuchungen dargestellt. Auf der X-Achse finden sich die untersuchten Zellmerkmale. Die Y-Achse zeigt den Anteil der untersuchten Zellen an allen gemessenen Zellen in %.

Tabelle 3.13.3.4.

Werte der Milzuntersuchung

Probe	TCR-/CD4-	TCR-/hu-HLA+/huCD4-	CD4-/hu-HLA+/huCD4-
Milz 133	69,18	65,12	60,80
Milz 137	57,40	28,73	33,87
Milz 141	65,62	66,29	63,32
Milz 145	68,75	68,58	66,48
Milz 149	64,57	60,91	63,04
Milz 153	67,85	52,09	52,04
Milz 157	61,48	41,05	41,89
Milz 161	64,31	31,94	37,87
Milz 165	70,49	84,66	71,19
Milz 169	69,39	79,99	63,36
Milz 173	62,99	59,13	54,83
Milz 177	58,18	52,64	49,00
Milz 181	68,55	67,50	70,11
Milz 185	67,24	60,83	65,39
Median	66	60,87	61,91

Hier sind die Werte der Milzuntersuchungen in einer Tabelle zusammengefasst. In der ersten Spalte sind die Probennummern aufgezählt. In den Spalten 2 bis 4 sind die gemessenen Werte im Blut der Versuchstiere mit den in der ersten Zeile aufgeführten Merkmalen aufgeführt. In der letzten Zeile sind die zu den Spalten gehörigen Medianwerte dargestellt.

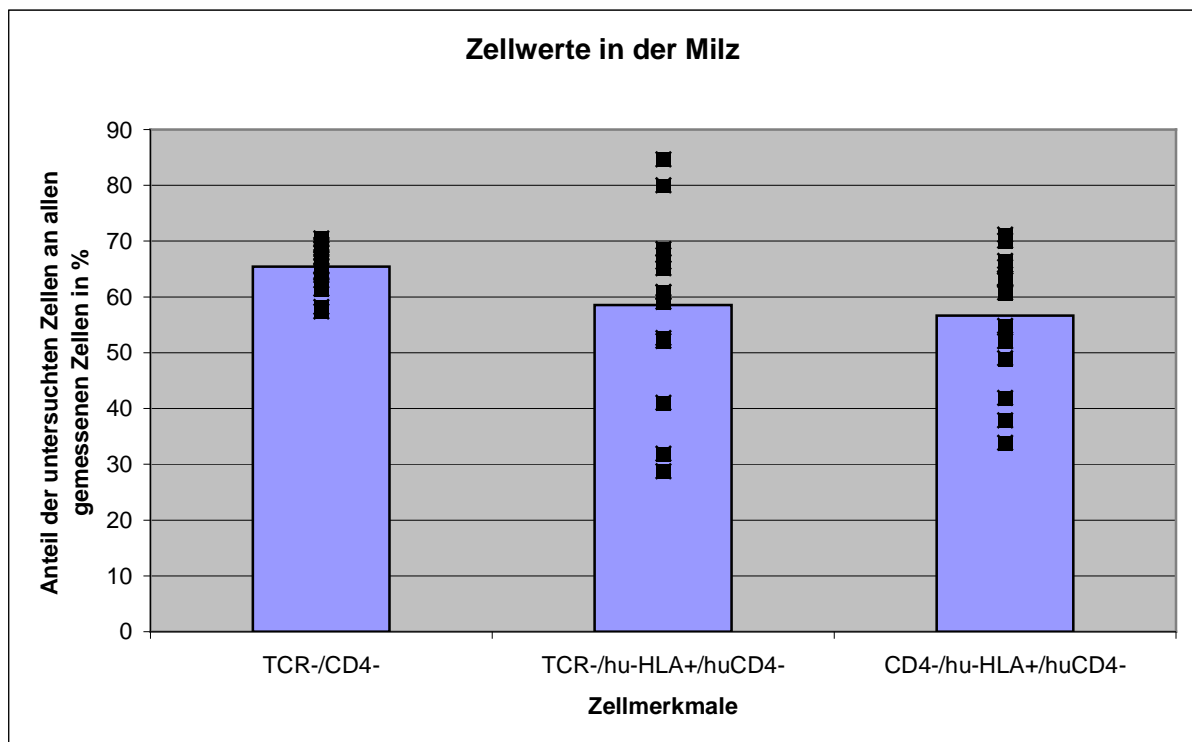


Abbildung 3.13.3.4.

Hier sind die Werte der Milzuntersuchungen dargestellt. Auf der X-Achse finden sich die untersuchten Zellmerkmale. Die Y-Achse zeigt den Anteil der untersuchten Zellen an allen gemessenen Zellen in %.

3.13.4. Zusammenfassung

In den Blutproben finden sich bei fast fünfundvierzig Prozent der untersuchten Tiere deutlich erhöhte Werte der T-Zellpopulation. Hier überwiegen die erhöhten T-Helferzellen (29,7% im Vergleich zu 16,2% zytotoxische T-Zellen), welche vorwiegend in den Blutproben von Tieren mit 4 Transgenen vorkommen. Im Thymus weisen etwa 32% der Mäuse T-Zellerhöhungen auf, wobei T-Helferzellen (vor allem bei Tieren mit 4 Transgenen) und zytotoxische T-Zellen (ausschließlich bei Tieren mit 3 Transgenen) zu gleichen Teilen erhöht sind. In der Milz ist dies bei 26% der Tiere der Fall. Hier findet man eine Erhöhung beider Zellpopulationen vor allem bei den Tieren mit 3 Transgenen. Aufgrund der klinischen Symptome aller untersuchten Tiere (Organvergrößerung) und dieser Untersuchungsergebnisse wird das Vorliegen eines T-Zell-Lymphomes bestätigt.

4. Diskussion

Bisher gibt es in der Literatur kein einheitliches Tiermodell, um die Induktion einer ovalbuminspezifischen Immunantwort unter genormten Bedingungen durchzuführen und im Folgenden zu modulieren. Es existiert damit kein einheitliches Mausmodell, an dem Wirkungsweise und Nebenwirkungen von monoklonalen Antikörpern untersucht werden können. Wir konzentrierten uns dabei auf den anti-CD4-Antikörper GK 1.5. Einige Versuche wurden mit diesem Antikörper bereits durchgeführt. Diese bezogen sich vor allem auf den Einsatz bei einzelnen Krankheitsbildern. So wurde eine Studie über die Behandlung antigeninduzierter Arthritis bei C57Black/6-Mäusen mit dem GK 1.5 durchgeführt [Pohlers et al. 2004]. Außerdem wurde die Wirkung dieses Antikörpers auf Tumoren untersucht, die unter anderem in BALB/c-Mäusen generiert wurden [Tawara et al. 2002].

Allerdings sind die Befunde aus den verschiedenen Publikationen wegen unterschiedlicher Protokolle nicht vergleichbar. Das Ziel unserer Arbeit war es deshalb, ein standardisiertes Mausmodell einer ovalbuminspezifischen Immunantwort zu etablieren. Dafür wählten wir DO11.10 T-Zell-Rezeptor-transgene Mäuse mit BALB/c-Hintergrund und OT-I und -II-Mäuse mit C57BL6-Hintergrund. Die DO11.10-Mäuse tragen einen T-Zell-Rezeptor auf einem großen Teil ihrer CD4-positiven T-Zellen, der spezielle Aminosäuresequenzen im Ovalbuminmolekül (OVA 323 – 339) erkennt und spezifisch an diese bindet [Robertson et al. 2000]. So war es möglich, eine für ein Antigen spezifische Immunreaktion nachzuweisen.

Die DO11.10-Mäuse sind in immunologischen Versuchsreihen sehr verbreitet, allerdings wurden in den meisten bisherigen Studien nur die Milzzellen dieser Tiere genutzt. Nachdem die Tiere getötet wurden, hat man diese Zellen isoliert, je nach Versuchsaufbau mit Ovalbumin oder anderen Substanzen behandelt und in andere Mausarten transferiert (zum Beispiel BALB/c-Mäuse). Dieser Versuchsaufbau wurde zum Beispiel in einer Arbeit zu einem Colitis-Modell genutzt [Pengfei et al. 2004]. Dabei wurden Milzzellen von DO11.10-Mäusen in C.B.17/SCID-bg-Mäuse transferiert. Hier konnte gezeigt werden, dass zwei verschiedene T-Zell-Untergruppen existieren. Eine Gruppe verhindert die Ausbildung einer Colitis, die andere begünstigt sie.

In den meisten vorangegangenen Versuchen wurden den Empfängern dieser Zellen entweder Ovalbumin oder andere Substanzen verabreicht, um die übertragenen

Zellen zu stimulieren. Das geschah bis auf wenige Ausnahmen über das Trinkwasser oder intranasal mit einem Aerosol. Es wurden zum Beispiel DO11.10- und BALB/c-Mäuse kontinuierlich Ovalbumin oral zugeführt, mit dem Ziel, systemische Toleranz gegen Ovalbumin zu induzieren [Simoni et al. 2004]. Dies gelang nicht bei den transgenen BALB/c-Mäusen, bei den transgenen DO11.10-Mäusen fand entgegengesetzt zu dem eigentlichen Ziel der Toleranzinduktion eine Immunisierung statt. Das Ergebnis bestätigte die Annahme, dass eine Immunisierung der DO11.10-Mäuse durch Ovalbumingabe zu erwarten ist. Bereits im Jahr 2000 veröffentlichte das „Journal of Immunology“ eine mit dem Titel „DO11.10 and OT-II T Cells Recognize a C-Terminal Ovalbumin 323-339 Epitope“ Arbeit [Robertson et al. 2000]. In dieser Arbeit wurden Milzzellen der beiden im Titel aufgeführten Mausarten mit Hühnerovalbuminpeptiden (Epitop 323-339) in verschiedenen Dosierungen stimuliert. Außerdem wurden Balb/c-Mäuse mit Ovalbumin subcutan immunisiert und nach neun Tagen wurden die Lymphknoten entfernt, um die entstandenen T-Zellen zu untersuchen. Es konnte nachgewiesen werden, dass sowohl DO11.10- als auch OT-II-Mäuse die gleichen Epitope (323-339) auf dem Ovalbuminmolekül erkennen.

In unseren Versuchen wurden die DO11.10-Mäuse verschiedenen Alters direkt mit unterschiedlichen Mengen Ovalbumin zwischen 0 und 1500 µg intraperitoneal immunisiert. Um den immunogenen Effekt des Ovalbumin zu verstärken, haben wir es an Aluminiumhydroxid-Adjuvans gebunden. Mittels eines ELISA wurden bei regelmäßigen Blutentnahmen die ovalbuminspezifischen Antikörpertiter der Versuchsmäuse kontrolliert. Diesen haben wir im Laufe der Versuchsreihen standardisiert. Die intraperitoneale Applikation hat sich in unseren Versuchen bewährt, da es keine Verluste von Ovalbumin-Antigen während der Verabreichung gibt.

Nach Auswertung aller Daten und Vergleich der Ergebnisse kommen wir zu folgenden Schlussfolgerungen:

- Die ovalbuminspezifischen IgG-Titer sind abhängig von mehreren Faktoren, zu denen in erster Linie die applizierte Ovalbumindosis zählt, aber auch das Geschlecht und das Alter der DO11.10-Mäuse. Die Höhe der Titer ist somit multifaktoriell bedingt.
- Laut unseren Versuchsergebnissen sind 250 µg die optimale Ovalbumindosis, um positive und hohe IgG-Titer zu bekommen. In den Versuchen fanden wir sowohl bei höheren, als auch bei niedrigeren Dosierungen signifikant

niedrigere IgG-Titer bei den Versuchstieren (Mood-Median-Test $p < 0,001,95$ % Konfidenzintervall). Ovalbuminkonzentrationen über 500 μg in 250 μl Lösung machen aufgrund der Lösungseigenschaften (hohe Zähflüssigkeit) eine vollständige Applikation mit unserer Methode nahezu unmöglich. Es wären größere Applikationsmengen notwendig, welche jedoch bei einer intraperitonealen Gabe eine zu große Belastung für die Maus darstellen würde. Im Rahmen einer Arbeit wurde Ovalbumin intraperitoneal verabreicht in einer Dosis von 2 mg pro Maus, gelöst in 250 μl Volumen und gekoppelt an Freund's Adjuvans mit dem Ziel, die Tiere zu immunisieren [Shepherd et al. 2000]. Sie erreichten Antikörper-Titer von bis zu 2 bei ovalbuminspezifischem IgG. Fraglich ist, wie das Problem der Zähflüssigkeit gelöst werden konnte, das in unseren Versuchen schon bei Mengen über 500 μg in 250 μl auftrat. Eventuell tritt eine geringere Zähflüssigkeit der Applikationslösung bei der Bindung an Freund's Adjuvans, wie in dieser Gruppe verwendet, auf. Die zweite Möglichkeit des größeren Applikationsvolumens entfällt, da in dieser Arbeit das gleiche Volumen verwendet wurde.

In unseren Versuchen fand sich bei einem Tier der Kontrollgruppe ein außergewöhnlich hoher IgG-Titer ($\text{OD} = 1,789$). Als mögliche Ursache kommt auf der einen Seite eine Verwechslung zweier Tiere zu Beginn der Arbeit in Frage. Mit der Zeit wurde der Umgang mit den Tieren vertraut und Fehlerquellen konnten so minimiert werden. Andererseits wäre auch ein Kontakt mit Ovalbumin nach der ersten Immunisierung denkbar. Ein Kontakt vor der ersten Immunisierung kann aufgrund des niedrigen IgG-Titers ($\text{OD} = 0,010$) in der Kontrolle vor Immunisierung ausgeschlossen werden.

Für nachfolgende Versuche sollten Männchen bevorzugt werden, da diese trotz der geringeren Anzahl von Weibchen in unseren Versuchen einen signifikant höheren IgG-Titer hatten (T-Test $p = 0,034$; 95 % Konfidenzintervall). Es konnten nicht mehr Weibchen in unseren Versuchen verwendet werden, da sie zur Zucht benötigt wurden. Nach Beendigung der Zucht waren sie für Versuchszwecke zu alt (> 250 Tage). Es ist natürlich möglich, dass aufgrund der niedrigeren Anzahl von weiblichen Versuchstieren eine Beeinflussung der Ergebnisse stattgefunden hat. In den schon existierenden Arbeiten wurden entweder die Geschlechter schon vor Versuchsbeginn getrennt, so zum Beispiel in einer Arbeit [Unger et al. 2003], in der nur weibliche

BALB/c-Mäuse verwendet wurden, oder es nahmen beide Geschlechter an den Versuchen teil, aber es wurden keine Unterschiede im Hinblick auf die Ergebnisse beschrieben. In einer anderen Arbeit [Kanaizumi et al. 2002] wurden DO11.10-Männchen und –Weibchen verwendet, auf eventuelle Unterschiede in den Ergebnissen wurde jedoch nicht eingegangen.

Eine interessante Sichtweise zeigt eine Arbeit [Barrat et al. 1997], welche den Einfluss von Geschlecht und Schwangerschaften auf verschiedene Merkmale des Immunsystems (Leukozyten- und Makrophagenpopulationen) beschreibt. Hier zeigte sich zwar eine temporäre Schwächung des Immunsystems bei weiblichen Tieren während der Schwangerschaft, welche jedoch durch eine Steigerung nach der Geburt wieder kompensiert wurde. Im Gegensatz dazu fand sich ein Rückgang des Immunsystems bei älteren Männchen. In unseren Versuchen zeigten ältere Tiere (Männchen und Weibchen) ebenfalls eine schwächere Immunantwort.

Die Versuchsmäuse sollten im Alter von mindestens 12 und höchstens 22 Wochen für die Versuche ausgewählt werden, anders als zum Beispiel bei 2 Arbeiten [Yu et al. 2004, Unger et al. 2003], die Mäuse im Alter von maximal 8 Wochen für ihre Studien verwendeten. Bei Tieren im Alter von 12 bis 22 Wochen fanden sich in unseren Versuchen die meisten Tiere mit hohen IgG-Titern. Bei Tieren, die jünger als 12 oder älter als 22 Wochen waren, fanden wir in den Versuchen signifikant niedrigere IgG-Titer.

Nach unseren Daten hat somit auch das Alter der Tiere einen signifikanten Einfluss auf die Höhe der IgG-Titer (Mood-Median-Test $p = 0,023$; 95 % Konfidenzintervall).

Die Menge an DO11.10+/CD4+-Zellen in den einzelnen Tieren hat nach unseren Ergebnissen keinen Einfluss auf den IgG-Titer. Eventuell hat die geringe Datenzahl einen Einfluss auf dieses Ergebnis, weshalb auch der Einfluss dieses Merkmales weiter untersucht werden sollte. Eine Aussage aus anderen Arbeiten bezüglich dieses Merkmales war nicht zu finden.

Diese Untersuchungen zeigen, dass die DO11.10-T-Zell-Rezeptor-transgenen Mäuse bei Berücksichtigung dieser Versuchsergebnisse für weitere Versuche, in denen eine Immunisierung notwendig ist, geeignet sind. Auch die Weiterführung des

Vorhabens, die Wirkungsweise und Nebenwirkungen des Anti-CD4-Maus-Antikörper GK 1.5 an einem Tiermodell zu erforschen, ist mit dieser Mausart denkbar.

Für unsere Versuchsreihen verwendeten wir neben den DO11.10 T-Zell-Rezeptor-transgenen Mäusen OT-I- und -II-Mäuse mit C57BL6-Hintergrund. Bereits während der Nachzuchtphase traten bei den Tieren zwei schwere Erkrankungen auf. Auf der einen Seite entwickelten mehrere Tiere Darmvorfälle, insbesondere die weiblichen Tiere nach dem ersten Wurf, was zu einem raschen Mangel an jungen Weibchen führte.

Auf der anderen Seite litten die Tiere an einem B-Zell-Lymphom, das eine massive Vergrößerung sowohl der Lymphknoten, als auch der intraabdominellen Organe mit sich brachte. Eine erfolgreiche Zucht dieser Tiere ist durch diese beiden Erkrankungen sehr schwierig und bedeutet für die erkrankten Mäuse starke Schmerzen. Diese Mausarten sind für unsere Versuche aufgrund der genannten Probleme nicht geeignet.

5. Zusammenfassung der Arbeit

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

Induktion einer ovalbuminspezifischen Immunantwort in T-Zell-Rezeptor-transgenen DO11.10-, OT-I- und OT-II-Mäusen durch intraperitoneale Gabe von Hühnerovalbumin

Eingereicht von: Kerstin Arndt

Angefertigt am/in: Universität Leipzig, Medizinische Fakultät, Institut für klinische Immunologie

Betreut von Prof. Dr. med. U. Sack

Januar 2012

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines einheitlichen Mausmodels, an dem eine Untersuchung der Toleranzinduktion durch einen CD4-Antikörper möglich ist. Zu diesem Zweck wurden DO11.10-, OT-I- und OT-II-T-Zell-Rezeptor transgene Mäuse mit einem Antigen immunisiert und anschließend die Höhe des spezifischen Antikörpertiters bestimmt. Um eine bessere Immunantwort zu erreichen, wurde das Antigen an eine Trägersubstanz gebunden (Aluminiumhydroxid). Die Applikation des Antigens (Hühnerovalbumin) erfolgte über eine intraperitoneale Injektion. Außerdem wurden die Tiere nach frühestens einem Monat mit der gleichen Antigendosierung geboostert. Die Ergebnisse wurden nach Abschluss der Arbeit unter verschiedenen Aspekten, wie Alter der Versuchstiere oder Dosis des Antigens betrachtet.

Einleitung

Neben den herkömmlichen Immunsuppressiva, welche eine hohe Rate an Nebenwirkungen aufweisen, existieren mittlerweile verschiedene monoklonale Antikörper mit immunmodulatorischer Wirkung. Die Angriffspunkte der Antikörper und damit die Wirkprinzipien und Nebenwirkungsprofile sind sehr unterschiedlich. Es existiert bereits eine Vielzahl von Studien, allerdings mit völlig unterschiedlichen Ansätzen. Das ist ein Grund, weshalb bis heute keine einheitliche Untersuchung und kein einheitliches Tiermodell zur Bestimmung der Idealdosis und des

Nebenwirkungsprofils existieren. Das Ziel dieser Arbeit war es, ein allgemeingültiges funktionsfähiges Mausmodell zu erarbeiten, um später die genaue Wirkungsweise, wirksame Dosen und mögliche Nebenwirkungen von monoklonalen Antikörpern, wie dem Anti-CD4-Antikörper GK1.5 untersuchen zu können und so Patienten besser vor unerwünschten Wirkungen schützen zu können.

Materialien und Methoden

Tiere

Für die Versuche im Rahmen dieser Arbeit wurden DO11.10 T-Zell-Rezeptor transgene Mäuse mit BALB/c-Hintergrund und OT-I und -II-Mäuse mit Black6-Hintergrund gewählt. Die DO11.10-Mäuse tragen einen T-Zell-Rezeptor auf einem Teil ihrer CD4-positiven T-Zellen, der spezielle Aminosäuresequenzen im Ovalbuminmolekül (OVA 323-339) erkennt und spezifisch an diese bindet. Dieser hochspezialisierte T-Zell-Rezeptor macht es möglich, mittels Immunisierung mit diesem Protein (in unseren Versuchen Hühner-Ovalbumin) hohe proteinspezifische IgG-Antikörper-Titer in den Mäusen zu generieren. Für die Versuche wurden beide Geschlechter im Alter zwischen 7 und 30 Wochen verwendet.

Reagenzien

Das in diesen Versuchen verwendete Ovalbumin ist ein vollständiges Hühnerovalbuminmolekül in Pulverform. Um die Immunantwort der Versuchsmäuse zu verbessern, wurde das Ovalbumin an Aluminiumhydroxid-Adjuvans gekoppelt. Mittels eines Bradford-Assay wurde vor der Applikation der Antigenlösung der Proteinverlust überprüft. Damit kann eine konstante Applikationsmenge gewährleistet werden.

Immunisierung

Die Immunisierung erfolgte mit Hühnerovalbumin (vollständiges Molekül) in Konzentrationen zwischen 0 und 1500 µg. Die Versuchsmäuse wurden in entsprechende Gruppen eingeteilt. Die beiden Kontrollgruppen erhielten entweder Aluminiumhydroxid in physiologischer Natriumchloridlösung oder reine physiologische Natriumchloridlösung. Die anderen Versuchsgruppen bekamen Ovalbumin in verschiedenen Konzentrationen (0 bis 1500 µg) intraperitoneal

appliziert. Blutentnahmen erfolgten an den Tagen 0 (direkt vor der Immunisierung), 3 und 6 nach der Immunisierung sowie vor und am Tag 6 nach der Boosterung.

ELISA

Die Bestimmung der IgM- und IgG-Titer erfolgte über einen ELISA. Um eine Standardisierung zu erreichen, wurde ab Versuch Zwei bei jedem ELISA eine Verdünnungsreihe mit einem IgM-Maus-anti-Ovalbumin-Antikörper (TEPC183) und einem IgG1-Maus-anti-Ovalbumin-Antikörper (Max16H5) mitgeführt. Aus den erhaltenen Werten wurde eine Kurve erstellt, mit deren Hilfe für jede Probe anhand des OD-Wertes die entsprechende Antikörperkonzentration ermittelt werden kann und Störfaktoren eliminiert werden können. Die Antikörperkonzentration kann später mit den Konzentrationen anderer Proben aus anderen Versuchen besser verglichen werden als die reinen OD-Werte.

Resultate

Einfluss der Versuchsreihen auf die Antikörper-Titer

Um Fehler innerhalb der Versuchsreihen auszuschließen, wurde der Einfluss der Versuchszugehörigkeit der einzelnen Tiere auf die IgG- und IgM-Titer untersucht. Dabei wurde überprüft, ob Mäuse einer Versuchsreihe signifikant höhere Antikörpertiter boten. Dies konnte ausgeschlossen werden. Die Versuchszugehörigkeit hatte keinen Einfluss auf die Antikörpertiter.

Einfluss der Ovalbuminmenge auf die Antikörpertiter

Während der einzelnen Versuche wurden Ovalbuminmengen von 0 bis 1500 µg appliziert. Nach Auswertung der Daten ist davon auszugehen, dass die Ovalbuminmenge einen signifikanten Einfluss auf die Höhe des IgG-Titers hat (Mood-Median-Test $p < 0,001$, 95 % Konfidenzintervall).

Einfluss des Geschlechtes auf die Antikörpertiter

Insgesamt nahmen an diesen Versuchsreihen 33 Männchen und 13 Weibchen teil. Die Betrachtung der Daten ergab, dass das Geschlecht einen Einfluss auf den IgG-Titer hat (T-Test $p = 0,034$; 95 % Konfidenzintervall).

Die OD-Werte der Weibchen waren in den durchgeführten Versuchen niedriger als die der Männchen mit vergleichbarer Ovalbuminmenge.

Einfluss des Alters auf den Antikörpertiter

Das Alter zu Beginn des Versuches wurde mit dem dazugehörigen OD-Wert in einer Tabelle aufgeführt und mit den KO-OD-Werten verglichen. Die Daten zeigten, dass Mäuse im Alter zwischen 87 Tagen und 150 Tagen am häufigsten positive IgG-Titer produzieren. Es wurde ein signifikanter Einfluss des Alters der Mäuse zu Beginn des Versuches auf die Höhe der IgG-Titer nachgewiesen (Mood-Median-Test $p = 0,023$; 95 % Konfidenzintervall).

Einfluss der DO11.10-CD4+-Expression auf die Antikörpertiter

Die Expression sowohl des DO11-, als auch des CD4+-Rezeptors auf derselben Zelle wurde mittels FACS-Analyse überprüft. Insgesamt wurden 17 Mäuse getestet. Die Auswertung der Daten ergab keinen Zusammenhang zwischen der Menge CD4+/DO11+-Zellen und der Höhe des IgG-Titers.

Diskussion

Nach Auswertung aller Daten und Vergleich der Ergebnisse kommen wir zu den folgenden Schlussfolgerungen. Die ovalbuminspezifischen IgG-Titer sind abhängig von mehreren Faktoren, zu denen in erster Linie die applizierte Ovalbumindosis zählt, aber auch das Geschlecht und das Alter der DO11.10-Mäuse. Laut unseren Versuchsergebnissen sind 250 µg die optimale Ovalbumindosis, um positive und hohe IgG-Titer zu bekommen. Außerdem sollten Männchen für diese Art von Versuchen bevorzugt werden, da dieses Merkmal trotz der geringeren Anzahl von Weibchen in den Versuchen einen eindeutigen Einfluss auf den IgG-Titer hat. Die Versuchsmäuse sollten im Alter von mindestens 12 und höchstens 22 Wochen für die Versuche ausgewählt werden. Die Menge an DO11.10+/CD4+-Zellen in den einzelnen Tieren hat nach unseren Ergebnissen keinen Einfluss auf den IgG-Titer. Da sowohl bei den OT-I- als auch bei den OT-II-Tieren bei unserer Zucht Darmvorfälle und schwere B-Zell-Lymphome auftraten, sind diese Tiere für unsere standardisierten Versuche nicht geeignet.

6. Literaturverzeichnis

1. Adler, S. H.; Turka, L. A. (2002)
Immunotherapy as a means to induce transplantation tolerance
Curr. Opin. Immunol. 14, 660-665
2. Agua-Doce, A., Graca L. (2007)
Induction of dominant tolerance using monoclonal antibodies
Methods Mol. Biology 380, 405-29
3. Barrat, F., Lesourd, B. M., Louise, A., Boulouis, H.-J., Vincent-Naulleau, S., Thibault, D., Sanaa, M., Neway, T., Pilet, Ch. (1997)
Sex and parity modulate cytokine production during murine ageing.
Clin. Exp. Immunol. 107, 593-600
4. Braun, J. M., Wenk, K., Oehme, S., Edelmann, S., Madaj-Sterba, P.
Observation of the appearance of severe B cell lymphoma in fully immunocompetent C57BL6 transgenic mice, expressing physiologically ovalbumin specific T cell receptor on either CD3+CD8+ T suppressor cells (OT-I) or on CD3+CD4+ T helper cells (OT-II)
5. Brewer, J. M., Conacher, M., Hunter, C. A., Mohrs, M, Brombacher, F., Alexander, J. (1999)
Aluminium Hydroxide Adjuvant Initiates Strong Antigen-Specific Th2 Responses in the Absence of IL-4- or IL-13-Mediated Signaling
J. Immunol. 163, 6448-6454
6. Burmester, G. R., Pezzuto, A. (1998)
Taschenatlas der Immunologie, Grundlagen, Labor, Klinik
Georg Thieme Verlag
7. Chatenoud, L., Waldmann, H., Emrich, F. (1995)
Tolerance induction in the adult: `danger` at Le Bischenberg

8. Chen, T.-C., Waldmann, H., Fairchild, P. J. (2004)
Induction of dominant transplantation tolerance by an altered peptide ligand of the male antigen DbY
J. Clin. Invest. 113, 1754-1762
9. Cobbold, S. P., Castejon, R.; Adams, E., Zelenika, D., Graca, L., Humm, S., Waldmann, H. (2004)
Induction of foxP3+Regulatory T Cells in the Periphery of T Cell Receptor Transgenic Mice Tolerized to Transplants
J. Immunol. 172, 6003-6010
10. Cortesini, R., Renna-Molajoni, E., Cinti, P., Pretagostini, R., Ho, E., Rossi, P., Suci-Foca Cortesini, N. (2002)
Tailoring of Immunosuppression in Renal and Liver Allograft Recipients Displaying Donor Specific T-Suppressor Cells
Hum. Immunol. 63, 1010-1018
11. Dijke, I. E., Weimar, W., Baan, C. C. (2008)
Regulatory T-cells after organ transplantation: where does their action take place?
Hum. Immunol. 69, 389-98
12. Doebeis, C., Siegmund, K., Loddenkemper, C., Lowe, J. B., Issekutz, A. C., Hamann, A., Huehn, J., Syre, U. (2008)
Cellular Players and Role of Selection Ligands in Leukozyte Recruitment in a T-Cell-Initiated Delayed-Type Hypersensitivity Reaction
Am. J. Pathol. 173, 1067-1076
13. Dong, V. M., Womer, K. L., Sayegh, M. H. (1999)
Transplantation tolerance: The concept and its applicability
Ped. Transplant. 3, 181-192

14. Drutman, S.B., Trombetta, E.S. (2010)
Dendritic Cells Continue To Capture and Present Antigens after Maturation in Vivo
J. Immunol. 185, 2140-2146
15. Eagar, T. N., Turley, D. M., Padilla, J., Karandikar, N. J., Tan, L., Bluestone, J. A., Miller, S. D. (2004)
CTLA-4 Regulates Expansion and Differentiation of Th 1 Cells Following Induction of Peripheral T Cell Tolerance
J. Immunol. 172, 7442-7450
16. Fehr, T., Sykes, M. (2004)
Tolerance Induction in clinical transplantation
Transplant Immunol. 13, 117-130
17. Fehr, T., Wüthrich, R. P. (2008)
Monoklonale Antikörper bei der Organtransplantation
Schweizer Med. Forum 8, 204-209
18. Graca, L., Le Moine, A., Lin, C.-Y., Fairchild, P. J., Cobbold, S. P. (2004)
Donor-specific transplantation tolerance: The paradoxical behaviour of CD4⁺CD25⁺-T-cells
PNAS 101, 10122-10126
19. Graca, L., Waldmann, H. (2006)
Reprogramming the immune system using antibodies
Meth. Mol. Biol. 333, 247-68
20. Grun, J. L., Maurer, P. H. (1989)
Different T Helper Cell Subsets Elicited in Mice Utilizing Two Different Adjuvant Vehicles: The Role of Endogenous Interleukin 1 in Proliferative Responses
Cell. Immunol. 121, 134-145

21. Han, W. R., Murray-Segal, L. J., Mottram, P. L. (1999)
Assessment of peripheral tolerance in anti-CD4 treated C57BL/6 mouse heart transplant recipients
Transplant Immunology, 7, 73-44
22. Harber, M., Sundstedt, A., Wraith, D. (2000)
The role of cytokines in immunological tolerance: potential for therapy
Exp. Rev. mol. Med. 2, 1-20
23. Haudebourg, T., Poirier N., Vanhove B. (2009)
Depleting T-cell subpopulations in organ transplantation
Transplant. Int. 22, 509-18
24. Kanaizumi, E., Shirasaki, H., Sato, J., Watanabe, K., Himi, T. (2002)
Establishment of Animal Model of Antigen-Specific T Lymphocyte Recruitment into Nasal Mucosa
Scand. J. Immunol. 56, 376-382
25. Köhler G., Milstein C. (1975)
Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity
Nature 256(5517), 495-7
26. Kohlhaw K., Sack, U., Lehmann, I., Drews, G., Schwarz, R., Hartwig, T., Tannapfel, A., Berr, F., Oertel, M., Marx, U., Lehmann, M., Wittekind, C., Hauss, J., Emmrich, F. (2001)
The monoclonal anti-CD4 antibody RIB5/2 induces donor-specific tolerance in the high-responder liver transplant model in the rat
Transplant Proc. 33, 2371-3
27. Kouskoff, V., Famiglietti, S., Lacaud, G., Lang, P., Rider, J. E., Kay, B. K., Cambier, J. C. (1998)
Antigens Varying in Affinity for the B Cell Receptor Induce Differential B Lymphocyte Responses

J. Exp. Med. 188, 1453-1464

28. Kurtz, J., Shaffer, J.; Lie, A., Anosova, N., Benichou, G., Sykes, M. (2004)
Mechanismus of early peripheral CD4 T-cell tolerance intuction by anti-CD154
monoclonal antibody and allogenic bone marrow transplantation; evidence for
anergy and deletion but not regulatory cells
Blood 11,4336-4343
29. Laub, R. Brecht, R., Dorsch, M., Valey, U., Wenk, K., Emmrich, F. (2002)
Anti-human CD4 induces peripheral tolerance in a human CD4+, murine CD4-,
HLA-DR+ advanced transgenic mouse model
J. immunol. 169, 2947-55
30. Lee, H.-O., Cooper, C. J., Chio, J.-H., Alnadjim, Z., Barrett, T. A. (2002)
The State of CD4+ T Cell Activation Is a Major Factor for Determining the
Kinetics and Location if T Cell Responses to Oral Antigen
J. Immunol. 168, 3833-3838
31. Lindblad, E. B., Elhay, M. J., Silva, R., Appelberg, Rui, Andersen, P. (1997)
Adjuvant Modulation of Immune Responses to Tuberculosis Subunit Vaccines
Infect. Immun. 65, 623-629
32. Mandel, T. E., Loveland, B. E., Henning, M. M. (1995)
Experimental transplantation models in small animals
Harwood Academic Publishers GmbH, Chapter 9,195-211
33. Neumann, J. (2008)
Immunbiologie: Eine Einführung
Springer Verlag Berlin Heidelberg
34. O'Hagan, Derek T. (2000)
Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols
Humana Press inc., Methods in Molecular Medicin Vol. 42

35. Oehme, S. (2006)

Induktion immunologischer Toleranz mittels Anti-CD4-Antikörper Therapie im Adoptiven Transfer Modell

Promotion, Medizinische Fakultät der Universität Leipzig

36. Oehme, S., Wenk, K., Arndt, K., Wilde, A., Emmrich, F., Braun, J. M.

Ovalbumin specific T cell receptor transgenic mice (DO11.10) provide an effective transfer model assessing the role of Treg cells and potential therapy of antigen induced arthritis

Script, Institute for Clinical Immunology and Transfusion Medicine, Interdisciplinary Centre for Clinical Research, University of Leipzig

37. Ozaki, A., Ishida, W., Fukata, K., Fukushima, A., Ueno, H. (2004)

Detection of Antigen-Specific T Cells in Experimental Immune-Mediated Blepharokonjunktivitis in DO11.10 T Cell Receptor Transgenic Mice
Microbiol. Immunol. 48, 39-48

38. Pape, K., Kouskoff, V., Nemazee, D., Tang, H. L., Cyster, J. G., Tze, L. E., Hippen, K. L., Behrens, T. W., Marc K. J. (2003)

Visualization of the Genesis and Fate of Isotype-switched B Cells during a Primary Immune Response

J. Exp. Med. 197, 1677-1687

39. Zhou P., Z., Borojevic, R., Streutker, C., Snider, D., Liang, H., Croitoru, K. (2004)

Expression of Dual TCR on DO11.10 T Cells Allows for Ovalbumin-Induced Oral Tolerance to prevent T Cell-Mediated Colitis Directed against Unrelated Enteric Bacterial Antigens

J. Immunol. 172, 1515-1523

40. Perry, I., Neuberger, J. (2005)

Immunosuppression: towards a logical approach in liver transplantation

Clin. Exp. Immunol. 139, 2-10

41. Pillai, A. A., Levitsky, J. (2009)
Overview of immunosuppression in liver transplantation
World J. Gastroenterol. 15, 4225-4233
42. Podojil, J. R., Turley, D. M., Miller, S. D. (2008)
Therapeutic blockade of T-cell antigen receptor signal transduction and costimulation in autoimmune disease
Adv. Exp. Med. Biol., 640, 234-51
43. Pohlers, D., Nissler, K., Frey, O., Simon, J., Petrow, P. K., Kinne, R.W., Bräuer, R. (2004)
Anti-CD4 monoclonal antibody treatment in acute and early chronic antigen-induced arthritis: influence on T helper cell activation
Clin. Exp. Immunol. 135, 409-415
44. Rasmussen, I. B., Lunde E., Michaelsen T. E., Bogen, B., Sandlie, I. (2001)
The principle of delivery of T cell epitopes to antigen-presenting cells applied to peptides from influenza virus, ovalbumin, and henn egg lysozyme: Implications for peptide vaccination
PNAS 98, 10296-10301
45. Robertson, J. M., Jensen, P. E., Evavold, B. D. (2000)
DO11.10 and OT-II T Cells Recognize a C-Terminal Ovalbumin 323-339 Epitope
J. Immunol. 164, 4706-4712
46. Romagnani, S. (2000)
T-Zell-Subsets (Th1 versus Th2)
Ann. Allergy Asthma Immunol. 85, 9-18
47. Schmetzer, O. (2009)
Immunologie
Urban und Fischer Verlag, 1. Auflage

48. Schrem, H., Barg-Hock, H., Strassburg, C.-P., Schwarz, A. Klemphauer, J. (2009)
Nachsorge bei Organtransplantierten
Deutsches Ärzteblatt 106, 148-155
49. Schroeder, S. (2008)
Toleranzinduktion in CD8+ T-Zellen durch kreuzpräsentierende DC
Dissertation, Ludwig-Maximilian-Universität München
50. Shepherd, D. M., Dearstyne, E. A., Kerkvliet, N. I. (2000)
The Effects of TCDD on the Activation of Ovalbumin (OVA)-Specific DO11.10
Transgenic CD4+ T cells in Adoptively Transferred Mice
Toxicol. Sci. 56, 340-350
51. Simoni, P. U., Fernandes, L. G. R., Gabriel, D. L., Tamashiro, M. S. C. (2004)
Induction of Systemic Tolerance in Normal but not in Transgenic Mice Through
Continuous Feeding of Ovalbumin
Scand. J. Immunol. 60, 257- 266
52. Simoni, P. U., Fernandes, L. G. R., Gabriel D. L., Tamashiro, M. S. C. (2009)
Effect of aging and oral tolerance on dendritic cell function
Braz. J. Med. Biol. Res. 43, 68-76
53. Spencer, C. T., Gilchuk, P., Dragovic, S. M., Joyce, S. (2010)
Minor histocompatibility antigens: presentation principles, recognition logic and
the potential for a healing hand
Curr. Opin. Organ. Transplant. 15, 512-525
54. Sprent, J., Kashimoto, H. (2001)
The thymus and central tolerance
Phil. Trans. R. Soc. Lond., B 365, 609-616
55. Stuart, R. W., Eacke M. K. (2002)

Targeting T cell costimulation in autoimmune disease
Expert Opin. Therapy Targets 6, 275-89

56. Tawara, I, Take, Yutaka, Uenaka, A, Noguchi, Y, Nakayama, E (2002)
Sequential Involvement of Two Distinct CD4+ Regulatory T Cells during the
Course of Transplantable Tumor Growth and Protection from 3-
Methylcholanthrene-induced Tumorigenesis by CD25-depletion
Jpn. J. Cancer Res., 93, 911-916
57. Thorstenson, K. M.; Khoruts, A. (2001)
Generation of Anergic and Potentially Immunoregulatory CD25+CD4 T Cells
In Vivo After Induction of Peripheral Tolerance with Intravenous or Oral
Antigen
J. Immunol. 167, 188-195
58. Trümper, L., Möller, P., Neubauer, A. (2001)
Non Hodgkin Lymphome
Lehrbuch der klinischen Onkologie, Springer Verlag
59. Unger, W. W. J., Hauet-Broere, F., Jansen, W., van Berkel, L. A., Kraal, G.,
Samson, J. N. (2003)
Early Events in Peripheral Regulatory T Cell Induction via the Nasal Mucosa
J. Immunol. 171, 4592-4603
60. Volk, HD., Siegling, A., Platzer, C., Brock, J., Emmrich, F., Lehmann, M.
(1994)
Tolerance induction by anti-CD4 MAb treatment in a rat kidney transplantation
model
Transplant. Proc. 26, 3155-6
61. Vorlaender, K.-O. (1983)
Immunologie: Grundlagen, Klinik, Praxis
Thieme-Verlag, 2. Auflage
62. Wahn, U., Seger, R., Wahn, V., Holländer G. A. (2005)
Pädiatrische Allergologie und Immunologie
Urban und Fischer Verlag, 4. Auflage

63. Waldmann, H., Cobbold, S. (1998)
How do monoclonal antibodies induce tolerance? A Role for Infectious Tolerance?
J. Immunol. 159, 2232-2239
64. Waldmann, H., Cobbold, S. (1993)
Monoclonal antibodies for the induction of transplantation tolerance
Curr. Opin. Immunol. 5, 753-8
65. Wilder, J. A., Collie, D. S., Bice, D. E., Tesfaigzi, Y., Lyons, R., Lipscomb, M. F. (2001)
Ovalbumin aerosols induce airway hyperreactivity in naïve DO11.10 T cell receptor transgenic mice without pulmonary eosinophilia or OVA-specific antibody
J. Leuk. Biol. 96, 538-547
66. Yu, X. MD., Sperling, A. PhD, Blair, C. BSc., Thompson, K. PhD, Naclerio, R. MD (2004)
Antigen stimulation of TH2 cells augments acute bacterial sinusitis in mice
J. Allergy Clin. Immunol, 2, 328-334
67. Zell, T., Khoruts, A., Ingulli, E., Bonnevier, J. L., Mueller, D. L., Jenkins, M. K. (2001)
Single-cell analysis of signal transduction in CD4 T cells stimulated by antigen in vivo
PNAS 98, 10805-10810
68. Zeng, W., Jackson, D. C., Murray, J., Rose, K., Brown, L. E. (2000)
Totally synthetic lipid-containing polyoxime peptide constructs are potent immunogens
Vaccine 18, 1031-1039

69. Zhao, Y., Swenson, K., Wekerle, T., Rodriguez-Barbosa, J. I., Arn, J. S., Sykes, M. (2000)

The critical role of mouse CD4⁺ cells in the rejection of highly disparate xenogenic pig thymus grafts

Xenotransplantation 7, 129-137

7. Danksagung

Zum Abschluss der Arbeit möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die mich mit ihrer Geduld und zahlreichen Ratschlägen unterstützt haben. Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Emmrich für die Vergabe des Themas bedanken. Ein großer Dank gebührt meinem Betreuer Herrn Dr. rer. nat. J. M. Braun und Frau Kerstin Wenk, die mir mit ihrer Erfahrung, viel Geduld und guten Ratschlägen auch in schwierigen Phasen der Arbeit stets beigestanden haben. Ganz besonders danke ich Herrn Prof. Dr. med. U. Sack, dass er mich mit positiver Kritik und guten Hinweisen geduldig unterstützt und mir somit den schnellen Abschluss dieser Arbeit ermöglicht hat.

Zuletzt möchte ich den wichtigsten Menschen in meinem Leben, meinen Eltern, danken, dass sie immer an mich geglaubt, mich unterstützt und positiv beeinflusst haben. Ohne sie wäre die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

8. Anlagen

Tabelle 1:

In dieser Tabelle wird die Ovalbuminmenge in Mikrogramm pro Maus (Spalte eins) dem IgG-Titer (OD-Wert) der betreffenden Maus (Spalte zwei) gegenübergestellt. Spalte drei gibt Auskunft darüber, ob der entsprechende IgG-Titer positiv oder negativ zu werten ist.

Ovalbumin	IgG-Titer	Titer-Wertung
0	0,035	N
0	0,016	N
0	0,011	N
0	0,007	N
0	0,006	N
0	0,014	N
0	0,026	N
0	0,023	N
0	0,020	N
0	1,789	P
0	0,027	N
0	0,021	N
0	0,008	N
0	0,006	N
0	0,005	N
25	0,187	N
25	0,071	N
25	0,126	N
25	0,331	N
25	1,381	P
50	0,051	N
50	0,922	P
50	3,181	P
50	2,518	P
50	0,885	P
50	0,295	N
50	0,118	N

250	0,333	N
250	3,038	P
250	0,750	P
250	3,651	P
250	0,255	N
250	1,685	P
250	3,408	P
250	0,069	N
250	1,313	P
250	0,041	N
500	0,084	N

Tabelle 2:

In der folgenden Tabelle sind alle Versuche, nach Ihren Nummern (Spalte eins) und Anfangsdaten (Spalte sechs) geordnet, aufgeführt. Die zweite Spalte enthält die applizierte Dosis pro Maus in Mikrogramm. In der dritten Spalte ist das Geschlecht der Versuchstiere aufgeführt, wobei das m für männlich und das w für weiblich steht. Das Alter der Mäuse zu Beginn des jeweiligen Versuches findet sich in Spalte vier. Es ist in Wochen angegeben. Die fünfte Spalte enthält die, sechs Tage nach der Boosterung gemessenen IgG-Titer. Diese sind als OD-Wert angegeben. Außerdem sind die positiven IgG-Titer blau gekennzeichnet. Die während der Versuch verstorbenen Tiere sind nicht mit aufgeführt.

Versuchsnummer	Dosis	Geschlecht	Alter	IgG-Titer	Versuchsbeginn/ Versuchsende
Versuch 1	0	m	10 Wo +3d	0,035	24.09.2004/ 11.10.2004
	100	m	27 Wo +5d	0,051	
	500	m	27 Wo +5d	0,041	
	1000	m	14 Wo +4d	0,084	
Versuch 2	0	w	13 Wo +5d	0,016	05.10.2004/ 06.12.2004
	0	m	13 Wo +5d	0,011	
	0	m	11 Wo	0,007	
	0	m	11 Wo	0,006	
	25	w	30 Wo +1d	0,187	
	25	m	13Wo +5d	0,071	

	25	m	13 Wo +5d	0,126	
	50	w	30 Wo +1d	0,922	
	50	m	13Wo +5d	3,181	
	50	m	13 Wo +5d	2,518	
	250	w	24 Wo +4d	0,333	
	250	m	13 Wo +5d	3,038	
Versuch 3	0	w	18 Wo +5d	0,014	30.11.2004/ 16.05.2005
	0	m	13 Wo +1d	0,026	
	0	m	13 Wo +1d	0,023	
	0	w	18 Wo +5d	0,020	
	25	w	21 Wo +5d	0,331	
	25	m	19 Wo	1,381	
	250	w	19 Wo	0,750	
	250	m	16 Wo +1d	3,651	
Versuch 4	0	w	7 Wo +2d	1,789	11.05.2005/ 22.06.2005
	0	m	7 Wo +2d	0,027	
	0	m	7 Wo +2d	0,021	
	0	w	7 Wo +2d	0,008	
	50	w	11 Wo +3d	0,885	
	50	m	11 Wo +3d	0,295	
	50	m	11 Wo +3d	0,118	
	250	w	11 Wo +3d	0,255	
	250	m	12 Wo +3d	1,685	
	250	m	12 Wo +3d	3,408	
Versuch 5	0	m	9 Wo +5d	0,006	20.09.2005/ 05.11.2005
	0	m	9 Wo +6d	0,005	
	250	m	9 Wo +6d	0,069	
	250	m	9 Wo +6d	1,313	

Tabelle 3:

In der folgenden Tabelle sind alle Versuche, nach Ihren Nummern (Spalte eins) und Anfangsdaten (Spalte sieben) geordnet, aufgeführt. Die zweite Spalte enthält die applizierte Dosis pro Maus in Mikrogramm. In der dritten Spalte ist das Geschlecht der Versuchstiere aufgeführt, wobei das m für männlich und das w für weiblich steht. Das Alter der Mäuse zu Beginn des jeweiligen Versuches findet sich in Spalte vier. Es ist in Wochen angegeben. Die fünfte und die sechste Spalte enthalten die, sechs Tage nach der Boosterung gemessenen IgG-Titer als OD- beziehungsweise KO-OD-

Werte, wobei die positiven Werte durch blaue Schrift gekennzeichnet sind. Die während der Versuche verstorbenen Tiere sind nicht mit aufgeführt.

Versuchsnummer	Dosis	Geschlecht	Alter	OD-Wert	KO-OD-Wert	Versuchsbeginn/-ende
Versuch 1	0	m	10 Wo +3d	0,035	-	24.09.2004/ 11.10.2004
	100	m	27 Wo +5d	0,051	-	
	500	m	27 Wo +5d	0,041	-	
	1000	m	14 Wo +4d	0,084	-	
Versuch 2	0	w	13 Wo +5d	0,016	0	05.10.2004/ 06.12.2004
	0	m	13 Wo +5d	0,011	0	
	0	m	11 Wo	0,007	0	
	0	m	11 Wo	0,006	0	
	25	w	30 Wo +1d	0,187	0,005	
	25	m	13Wo +5d	0,071	0,002	
	25	m	13 Wo +5d	0,126	0,004	
	50	w	30 Wo +1d	0,922	0,021	
	50	m	13Wo +5d	3,181	0,104	
	50	m	13 Wo +5d	2,518	0,068	
	250	w	24 Wo +4d	0,333	0,008	
	250	m	13 Wo +5d	3,038	0,095	
Versuch 3	0	w	18 Wo +5d	0,014	0,002	30.11.2004/ 16.05.2005
	0	m	13 Wo +1d	0,026	0,003	
	0	m	13 Wo +1d	0,023	0,003	
	0	w	18 Wo +5d	0,020	0,003	
	25	w	21 Wo +5d	0,331	0,01	
	25	m	19 Wo	1,381	0,019	
	250	w	19 Wo	0,750	0,014	
	250	m	16 Wo +1d	3,651	0,059	
Versuch 4	0	w	7 Wo +2d	1,789	0,055	11.05.2005/ 22.06.2005
	0	m	7 Wo +2d	0,027	0,001	
	0	m	7 Wo +2d	0,021	0,001	
	0	w	7 Wo +2d	0,008	0	
	50	w	11 Wo +3d	0,885	0,026	
	50	m	11 Wo +3d	0,295	0,01	
	50	m	11 Wo +3d	0,118	0,004	
	250	w	11 Wo +3d	0,255	0,008	
	250	m	12 Wo +3d	1,685	0,052	
	250	m	12 Wo +3d	3,408	0,142	

Versuch 5	0	m	9 Wo +5d	0,006	0	20.09.2005/ 05.11.2005
	0	m	9 Wo +6d	0,005	0	
	250	m	9 Wo +6d	0,069	0,002	
	250	m	9 Wo +6d	1,313	0,04	